

**Behandlung des schwergradig persistierenden
Asthma bronchiale mit Interferon- α
Charakterisierung der klinischen, pharmakologischen und
immunologischen Wirkung im Rahmen einer Pilotstudie**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

(Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Nicole Bergmann

geboren am 07.02.1979 in Greiz

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Claus Kroegel
2. Prof. Dr. med. Gert Hein
3. Prof. Dr. med. Roland Buhl

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.06.2006

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Ätiologie und Epidemiologie des Asthma bronchiale.....	1
1.2 Pathogenetische Grundlagen des Asthma bronchiale.....	1
1.3 Klinik des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale.....	6
1.4 Therapie des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale	7
2 Ziele der Arbeit	10
3 Patienten, Material und Methoden	12
3.1 Patienten	12
3.1.1 Patientencharakteristika	12
3.1.2 Therapieschema	14
3.1.3 Patientenfragebogen	15
3.1.4 Lungenfunktionsdiagnostik	16
3.2 Materialien.....	16
3.2.1 Geräte.....	16
3.2.2 Chemikalien und Biochemikalien	17
3.2.3 Antikörper gegen Oberflächenantigene	17
3.2.4 Zytokin-Antikörper.....	18
3.2.5 Verwendete Software	18
3.3 Methoden	18
3.3.1 Differentialblutbild	18
3.3.2 Durchflusszytometrie	19
3.3.2.1 Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenantigenen	19
3.3.2.2 Analyse der Zytokinproduktion mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie	21

3.3.3	Statistik	22
4	Ergebnisse	23
4.1	Klinische Effekte der Interferon- α -Therapie	23
4.1.1	Subjektives Befinden	23
4.1.2	Entwicklung der Lungenfunktion unter Interferon- α -Therapie	26
4.1.2.1	Forcierte Einsekundenkapazität	26
4.1.2.2	Quotient aus FEV ₁ und VC	27
4.1.2.3	Residualvolumen	29
4.1.2.4	Atemwegswiderstand	30
4.2	Pharmakologische Effekte der Interferon- α -Therapie	31
4.2.1	Glukokortikoidtherapie	31
4.2.2	Einsatz von β_2 -Mimetika	32
4.3	Immunologische Effekte der Interferon- α -Therapie	32
4.3.1	Zahl der eosinophilen Granulozyten	32
4.3.2	Phänotyp eosinophiler Granulozyten	33
4.3.3	Lymphozyten-Subpopulationen	39
4.3.4	Phänotyp von CD4 ⁺ -T-Lymphozyten	46
4.3.5	Intrazelluläre Zytokinexpression in CD4 ⁺ -T-Lymphozyten	54
4.3.5.1	Th1-assoziierte Interleukine	54
4.3.5.2	Th2-assoziierte Interleukine	57
4.3.5.3	Gegenüberstellung der Zytokinexpression	61
5	Diskussion	62
5.1	Struktur und Funktion von Interferon- α	62
5.2	Charakterisierung der therapeutischen Wirksamkeit von Interferon- α	63
5.3	Klinische Effekte von Interferon- α bei der Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale	64
5.3.1	Patientenbefinden und körperliche Leistungsfähigkeit	65
5.3.2	Lungenfunktion	67
5.3.3	Nebenwirkungen	70
5.4	Pharmakologische Effekte von Interferon- α bei der Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale	71

5.5	Immunologische Effekte von Interferon- α bei der Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale	73
5.5.1	Einfluss auf Effektorzellen	73
5.5.2	Einfluss auf Regulatorzellen	80
5.5.3	Einfluss der Interferon- α -Therapie auf die Th1/Th2-Balance bei schwergradig persistierendem Asthma bronchiale	84
5.5.3.1	Th1-Zytokinexpression unter Interferon- α -Therapie.....	84
5.5.3.2	Th2-Zytokinexpression unter Interferon- α -Therapie.....	87
5.6	Hypothetischer Wirkmechanismus und therapeutische Bedeutung von Interferon- α bei der Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale.....	91
5.7	Limitationen der Untersuchung	94
5.8	Ausblick.....	96
6	Literaturverzeichnis	98
	Danksagung.....	110
	Lebenslauf	111
	Publikationen.....	111
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	113

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
APC	Allophyocyanin
ANA	Antinukleäre Antikörper
CD	Cluster of differentiation
CSS	Churg-Strauss-Syndrom
Cy5	Cyanine 5
ECP	Eosinophil cationic protein
EDN	Eosinophil derived neurotoxin
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
FACS	Fluorescence activated cell sorter (Durchflusszytometer)
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
FEV ₁	Forciertes expiratorisches Volumen in der 1. Sekunde
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
γ -GT	γ -Glutamyltransferase
GC	Glukokortikosteroid
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
Gpt/L	Gigapartikel pro Liter
HES	Hypereosinophiles-Syndrom
HLA	Histokompatibilitätsantigen
IE	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LDH	Lactatdehydrogenase
LT	Leukotrien
KCl	Kalium-Chlorid
mAK	Monoklonaler Antikörper
MAK	Mikrosomale Antikörper
MBP	Major basic protein
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotin-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

NaN ₃	Natrium-Azid
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
p-ANCA	Pulmonal antineutrophilic cytoplasmatic antibodies
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGE	Platelet derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PEF	Peak expiratory flow (expiratorischer Spitzenfluss)
PMA	Phorbol myristate acetate
RANTES	Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted
RPMI	Roswell park memorial institute
RV	Residualvolumen
SARS	Severe acute respiratory syndrome
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TAK	Thyreoglobulin-Antikörper
TGF-β	Transforming growth factor-β
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
TSH	Thyreostimulierendes Hormon
VC	Vitalkapazität

Selten verwendete Abkürzungen werden an der jeweiligen Textstelle erläutert.

Zusammenfassung

Das klinische Bild charakterisiert das schwergradig persistierende Asthma bronchiale als lebensbedrohliche und die Lebensqualität auf Dauer erheblich beeinträchtigende Erkrankung. Trotz aller Fortschritte bei der Behandlung des Asthma bronchiale in den letzten Jahren besteht für diese schwerste Verlaufsform der Erkrankung unverändert eine Behandlungslücke. Ziel dieser Studie war es deshalb, das therapeutische Potenzial von Interferon- α bei der Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale im Hinblick auf klinische, pharmakologische und immunologische Kriterien zu untersuchen.

Die Behandlung der Asthmatiker folgte einem definierten Therapieschema mit der wöchentlich subkutanen Gabe von $3 \times 9 \mu\text{g}$ Interferon- α (Inferax[®] Yamanouchi, Deutschland) über einen Zeitraum von 12 Monaten. Zu den Messzeitpunkten, vor Therapiebeginn, nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten, wurden klinische, pharmakologische und immunologische Parameter ermittelt. In die Studie wurden insgesamt acht weibliche Patienten (mittleres Alter 49 [35 - 68] Jahre) mit einer Erkrankungsdauer im Median von 16 [5 - 24] Jahren und einer langjährigen oralen Glukokortikoidtherapie (20 [5 - 65] mg/d) eingeschlossen. Die Darstellung der klinischen und der pharmakologischen Veränderungen erfolgte mittels Lungenfunktionsdiagnostik und Fragebogen. Darüber hinaus wurden im peripheren Blut Zahl und Verteilung der Blutzellen sowie deren Subpopulationen gemessen und relevante Oberflächenantigene auf eosinophilen Granulozyten, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Schließlich erfolgte eine Analyse der Zytokinexpression in CD4⁺-T-Lymphozyten mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Therapie mit Interferon- α zu einer deutlichen Besserung der asthmatischen Symptomatik, wie einer Reduktion der Asthmaanfälle/Tag, der nächtlichen Dyspnoeanfälle/Monat, der Notarztbesuche/Monat, der Krankenhausaufenthalte/Jahr sowie des Einsatzes kurzwirksamer β_2 -Mimetika, führt. Ferner verbesserten sich unter Interferon- α der Lungenfunktionsparameter FEV₁ und der Quotient aus FEV₁/VC. Gleichzeitig konnte unter der Behandlung die Dosis der systemischen Glukokortikoide reduziert werden. Bei fünf Patienten war es während des Behandlungszeitraumes möglich, vollständig

auf orale Glukokortikoide zu verzichten. Die immunologischen Veränderungen unter IFN- α -Therapie umfassten eine Reduktion der Zahl eosinophiler Granulozyten, eine Abnahme des relativen Anteils der B-Zellen und der γ/δ -T-Lymphozyten sowie eine Erhöhung des relativen Anteils der CD8⁺-T-Lymphozyten und der NK-Zellen. Zudem zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expressionsdichte von IL-2 und IFN- γ in CD4⁺-T-Lymphozyten, während IL-4, IL-5, IL-10 und TNF- α keine signifikante Änderung der Expressionsdichte zeigten. Nebenwirkungen der Behandlung mit Interferon- α , wie Fieber, Gelenk- und Muskelschmerzen, Inappetenz und Übelkeit, waren passager nachweisbar und bildeten sich im Laufe der Therapie zurück. Bei drei Patienten bestanden diese Nebenwirkungen für mehrere Monate fort und führten zu einer Veränderung der Dosierung.

Die Resultate der vorliegenden Studie belegen, dass die Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale mit Interferon- α zu einer deutlichen Reduktion der Krankheitssymptome, zu einer verbesserten Kontrolle der Erkrankung und zu einem Zugewinn an Lebensqualität für den Patienten führt. Interferon- α ist damit das erste wirksame Medikament für die Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale.

1 Einleitung

1.1 Ätiologie und Epidemiologie des Asthma bronchiale

Asthma bronchiale zählt zu den häufigsten chronischen Erkrankungen und damit zu den großen Volkskrankheiten der westlichen Industrieländer. Seit Anfang der 80er Jahre zeigen weltweite Studien einen kontinuierlichen Anstieg der Asthmaprävalenz (Kroegel 2002). Epidemiologische Erhebungen belegen, dass sich das Vorkommen von Asthma über einen Zeitraum von 20 Jahren von der Elterngeneration zu deren Nachkommen mehr als verdoppelt hat (Kroegel 2002). Zwischen 4 und 6 % der erwachsenen Bevölkerung sowie 6 % der Kinder und 12 % der Jugendlichen leiden allein in Deutschland an einem Asthma bronchiale. Das entspricht einer Fallzahl zwischen 3,2 und 4,8 Millionen betroffener Menschen. Asthma ist nach wie vor eine potenziell tödlich verlaufende Erkrankung. Parallel zur Prävalenz des Asthma bronchiale scheint auch die Mortalität dieser Erkrankung anzusteigen. Laut Totenscheindiagnose sterben in Deutschland pro Jahr mehr als 6.000 Personen an den Folgen der Erkrankung. Die hierfür verantwortlichen Faktoren sind bisher nicht sicher bekannt, dürften aber mit der Zunahme der allergischen Erkrankungen durch genetische Disposition sowie der Veränderung der Umwelt und der Lebensgewohnheiten im Zusammenhang stehen (Kroegel 2002).

1.2 Pathogenetische Grundlagen des Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronisch-inflammatorische Erkrankung des unteren Respirationstraktes mit variabler und reversibler Atemwegsobstruktion auf dem Boden einer chronischen Entzündung der Atemwege (Beeh und Buhl 2001). Die Einsichten zur bronchialen Entzündung als pathogenetische Basis des Asthma bronchiale haben grundlegende Bedeutung für Diagnose, Prävention und Behandlung der Erkrankung (Kroegel et al. 2001).

Immunologisch basiert die Entzündung auf einer komplexen Interaktion verschiedener Entzündungs- und Strukturzellen sowie ihrer Produkte (Kroegel et al. 2001, Kroegel 2002). Hierzu zählen vor allem Mastzellen, eosinophile Granulozyten,

T-Lymphozyten, bronchiale Epithelzellen sowie Myofibroblasten (Kroegel 2002). So besitzen $CD4^+$ -T-Zellen einen zentralen regulatorischen Einfluss auf die inflammatorische Reaktion im Rahmen des Asthma bronchiale. Mittels Sekretion spezifischer Zytokine (Tab. 1.1) steuern sie Dynamik und Ausprägung der Erkrankung (Kroegel et al. 1995, Virchow et al. 1995).

Tabelle 1.1: Übersicht über die für Asthma bronchiale relevanten Zytokine. Es sind die wichtigsten sezernierenden Zellen und Zielzellen sowie die Hauptwirkungen angegeben.

Zytokin	Zytokin-produzierende Zelle	Hauptzielzelle(n)	Hauptwirkung
IFN- γ	Th1-Zellen, NK-Zellen	Lymphozyten, Monozyten, Gewebezellen	Immunregulation, B-Zell-Differenzierung
TNF- α	Makrophagen, Lymphozyten	Makrophagen, Granulozyten, Gewebezellen	Aktivierung, Adhäsion am Endothel
IL-2	Th1-Zellen, NK-Zellen	T-Zellen, B-Zellen, Monozyten	Aktivierung und Proliferation
IL-4	Th2-Zellen	B-Zellen	Teilung und Differenzierung
IL-5	Th2-Zellen	B-Zellen, Eosinophile	Differenzierung, IgE-switch
IL-10	Th2-Zellen	Th1-Zellen	Hemmung der IFN- γ -Produktion
IL-12	B-Zellen, Makrophagen	Th0-Zellen	Differenzierung zu Th1-Zellen
IL-13	Th2-Zellen	B-Lymphozyten	Humorale Immunantwort

Es werden zwei prinzipielle Formen des Asthma bronchiale unterschieden. Das extrinsische oder allergische Asthma ist eine mit Umweltallergenen assoziierte Atemwegserkrankung, die saisonal rezidivierend mit der Erhöhung der Eosinophilenzahl im Blut sowie des allergenspezifischen und Gesamt-IgE einhergeht. Im Gegensatz dazu entwickelt sich das intrinsische Asthma bronchiale in der Mehrzahl der Fälle nach einem respiratorischen Infekt (Kroegel 2002). Möglicherweise spielen dabei endogene Faktoren im Sinne einer autoimmunologischen Erkrankung eine Rolle (Kroegel et al. 1993, Kroegel et al. 1997). Dabei ist die immunologische Endstrecke in der Pathogenese beim intrinsischen und extrinsischen Asthma im Sinne einer von Eosinophilen dominierten Entzündung vergleichbar (Kroegel et al. 1995).

Den Ausgangspunkt der asthmatisch-allergischen Entzündung bildet der Kontakt zwischen den antigen-präsentierenden Zellen (APCs) und dem potenziellen Allergen. Mit der Allergenerkennung werden Amplifikationsprozesse in Gang gesetzt, die mit einer klonalen T-Zellproliferation und der Differenzierung einer spezifischen Lymphozyten-Subpopulation einhergehen (Kroegel et al. 2001). Funktionell lassen sich diese Zellen dem so genannten Th2-Phänotyp zuordnen. Damit trägt das Asthma bronchiale die wesentlichen Züge einer Th2-Zell-dominierten Immunantwort (Simon und Foster 1999, Beeh und Buhl 2001). Dies konnte durch zahlreiche Studien, die eine erhöhte Zahl aktivierter $CD4^+$ -T-Zellen im allergisch-entzündlichen Gewebe nachgewiesen haben, belegt werden (Kroegel et al. 1995, Virchow et al. 1995). Man geht davon aus, dass über die Freisetzung von IL-4, IL-5 und IL-13 die Th2-Lymphozyten die Synthese von IgE durch B-Lymphozyten steuern und gleichzeitig eosinophile Granulozyten aktivieren (Beeh und Buhl 2001, Kroegel 2002). Außerdem wirken IL-4 und IL-10 hemmend auf die IL-2- und IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen und erhalten so die Th2-Dominanz der asthmatischen Entzündungsreaktion aufrecht. So kann bei Zellen des Th2-Phänotyps von „proallergischen“ T-Lymphozyten gesprochen werden (Kroegel 2001, Tournoy et al. 2001). Im Gegensatz dazu supprimieren Th1-Lymphozyten über die Freisetzung von IFN- γ die Synthese von IgE ebenso wie die Proliferation von B-Zellen (Kroegel et al. 2001). Die an der Differenzierung von $CD4^+$ -T-Lymphozyten in Richtung einer Th2-Dominanz beteiligten initialen Faktoren und Bedingungen sind zu

einem großen Teil nach wie vor unbekannt (Kroegel 2002). Ein Modell der Differenzierung naiver Th0-Zellen in Th1- und Th2-Lymphozyten zeigt Abbildung 1.1.

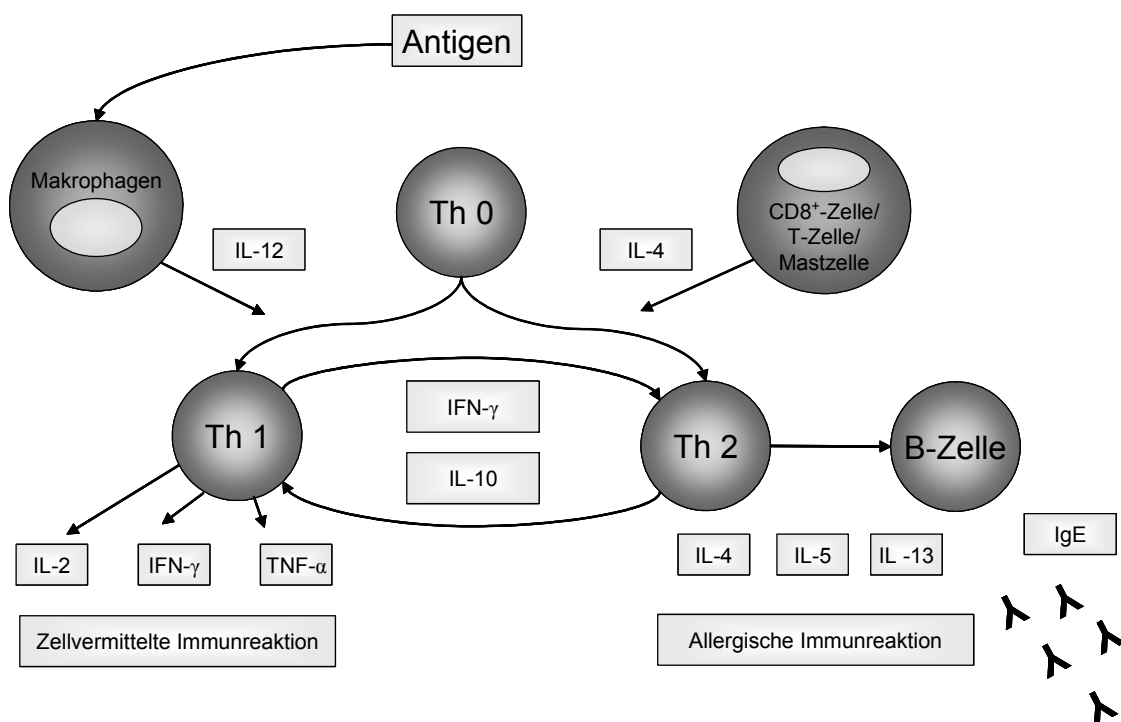


Abbildung 1.1: Differenzierung der Th0-Zellen in Th1- und Th2-Lymphozyten. Dargestellt ist die Dichotomie der Th-Zellen nach ihren sekretorischen Eigenschaften. Th1-Zellen induzieren über die Sekretion von IL-2, IFN- γ und TNF- α eine zellvermittelte Immunreaktion. Th2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und bewirken über die B-Zellproliferation eine allergische Immunreaktion. Asthma bronchiale ist durch eine Th2-Zelldominanz gekennzeichnet. Modifiziert nach Kroegel 2002.

Die asthmatische Frühreaktion entwickelt sich innerhalb von nur wenigen Minuten nach Allergenexposition und imponiert klinisch durch eine ausgeprägte Bronchialverengung, die sich im Verlauf von ein bis zwei Stunden spontan wieder zurückbildet (Bousquet et al. 1990, Kroegel 1998). Pathogenetisch liegt ihr vor allem die Aktivierung von Mastzellen über die klassische, IgE-vermittelte Immunreaktion vom Soforttyp zugrunde.

Im Gegensatz zur Frühreaktion ist die asthmatische Spätreaktion durch eine Dominanz eosinophiler Granulozyten gekennzeichnet (Kroegel et al. 2001), die langfristig eine Reihe morphologischer Veränderungen induzieren. Die eosinophilen Granulozyten akkumulieren im Bronchialgewebe und sezernieren ein breites Spektrum an Entzündungsmediatoren. Hierzu zählen Lipidmediatoren, Zytokine, Sauerstoffradikale und eine Reihe basischer Proteine, wie das „Major basic protein“

(MBP), das „Eosinophil cationic protein“ (ECP), das „Eosinophil derived neurotoxin“ (EDN), der „Plättchen aktivierende Faktor“ (PAF) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) (Busse und Lemanske 2001, Kroegel 2001). Charakteristisch für diese Veränderungen, dem so genannten „Atemwegsremodelling“, ist eine von Eosinophilen dominierte Gewebeeinfiltration, die Zerstörung und Desquamation des Bronchialepithels, eine Hyperplasie der glatten Muskel- und Drüsenzellen sowie eine Verbreiterung der bronchialen Basalmembran (Bousquet et al. 2000, Kroegel 2002). Die Abbildung 1.2 zeigt eine vereinfachte Darstellung dieses Pathomechanismus.

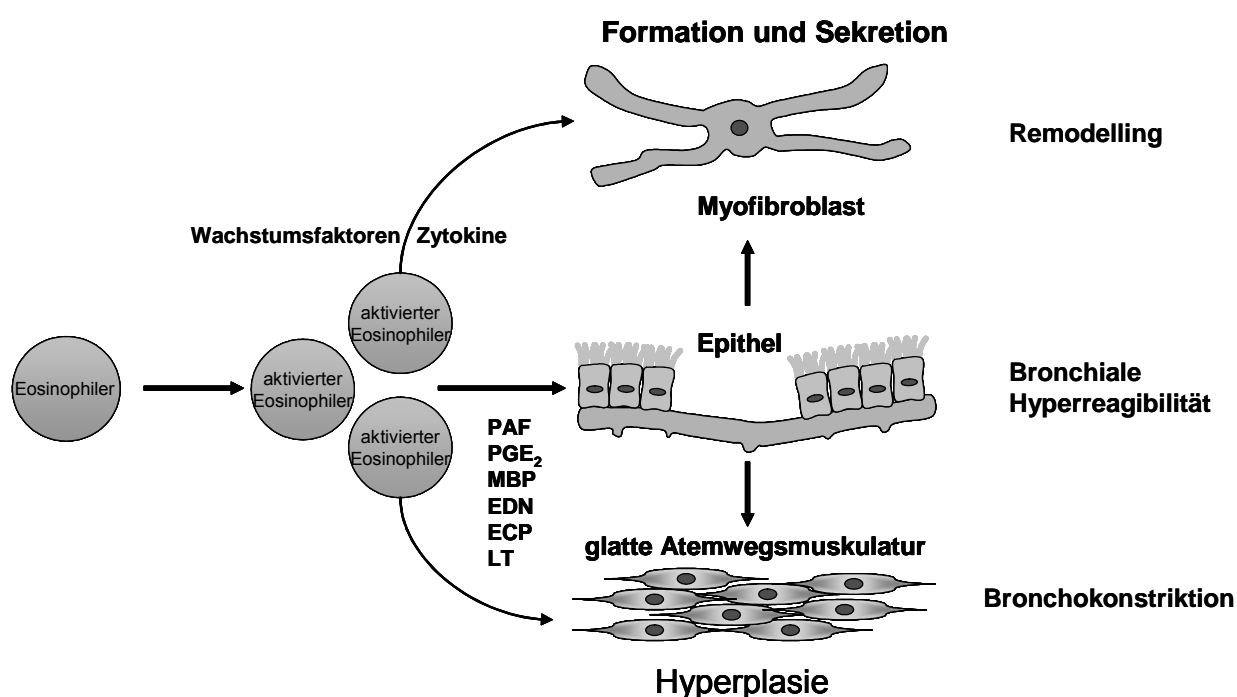


Abbildung 1.2: Rolle des eosinophilen Granulozyten beim Atemwegsremodelling im Rahmen des Asthma bronchiale. Der Eosinophile sezerniert eine Reihe von Mediatoren, die zytotoxische Wirkungen auf das Bronchialepithel ausüben. Längerfristig führen sie zu einer Hyperplasie der glatten Atemwegsmuskulatur sowie zu einer Differenzierung von Myofibroblasten und zu einer Sekretion von Kollagenfasern. Modifiziert nach Williams 2004.

Im Rahmen des Atemwegsremodellings kommt es zu einer peribronchialen Fibrosierung der Atemwege mit einer verdickten kollagenhaltigen Bindegewebsschicht. Die Folgen sind eine direkte Verengung des Atemwegsvolumens, eine Reduktion der Elastizität der Atemwege und eine verstärkte Lumenobstruktion. Diese strukturellen Veränderungen tragen zu dem

chronischen Verlauf der Erkrankung, zu einer Fixierung der Bronchialobstruktion mit persistierender Symptomatik sowie zu einer abnehmenden Reversibilität unter bronchialerweiternden Medikamenten bei (Kroegel et al. 2001).

1.3 Klinik des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale

Die klinische Manifestation der Erkrankung reicht von leicht symptomatischen über häufig rekurrende Formen bis hin zum schwergradig persistierenden Asthma bronchiale und dem Status asthmaticus (Kroegel 2002). Die bronchiale Hyperreagibilität kann sowohl auf spezifische Allergene als auch auf unspezifische inhalative Reize und Noxen, wie Rauch, Kälte und Duftstoffe, ausgeprägt sein (Kroegel et al. 2001). Es zeigt sich eine rekurrende bis persistierende Atemwegsobstruktion mit Giemen, Brummen und Dyspnoe sowie zähglasigem Sputum (Gerok et al. 2000, Kroegel 2002). Es fallen weiterhin eine akute Lungenüberblähung mit hypersonorem Klopfschall über der gesamten Lunge und wenig verschiebbliche, tiefstehende Atemgrenzen auf (Matthys 1988). Auf der Grundlage wissenschaftlicher Erkenntnisse hat die Deutsche Atemwegsliga die Erkrankung nach dem Schweregrad in 4 Stufen eingeteilt (Tab. 1.2).

Tabelle 1.2: Diagnostische Kriterien zur Ermittlung des Asthma-Schweregrades. Modifiziert nach: Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Asthma, herausgegeben von der Deutschen Atemwegsliga e.V. und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie.

Bezeichnung/Schweregrad			Symptome		FEV ₁ / PEF [%]
			Tag	Nacht	
IV	persistierend	schwergradig	ständig	häufig	≤ 60 > 30
III		mittelgradig	täglich	> 1-mal/ Woche	> 60 - < 80 20 - 30
II		geringgradig	> 1-mal/Woche < 1-mal/Tag	> 2-mal/Monat	≥ 80 20 - 30
I	intermittierend		≤ 1-mal/Woche, dazwischen asymptomatisch	≤ 2-mal/Monat	≥ 80 < 20

Etwa 5 - 8 % aller Asthmatiker leiden an einem schwergradig persistierenden Asthma bronchiale (Schweregrad IV). Diese Patientengruppe ist durch einen erheblichen Verlust von Lebensqualität und durch die höchste Asthmamortalität charakterisiert.

Sie verursacht zudem die höchste Kostenrate (Willer und Menz 2003). Klinisch manifestiert sich diese schwerste Verlaufsform des Asthma bronchiale durch ununterbrochen anhaltende Beschwerden, die sowohl tagsüber als auch in vielen oder allen Nächten auftreten. Bereits geringste Anforderungen des täglichen Lebens, wie An- und Auskleiden, Zähneputzen, Einkaufen oder Treppensteigen, können nur begrenzt oder gar nicht bewältigt werden (Kroegel 2001). Bei dem schwergradig persistierenden Asthma bronchiale bestehen kontinuierlich Dyspnoe und nächtliche Asthmaattacken mit einem ausgeprägten „Morgentief“. Die Lungenfunktion ist permanent und zum Teil sehr stark eingeschränkt ($FEV_1 < 60 \%$). Ihre bodyplethysmographische Bestimmung zeigt eine schwergradig obstruktive Ventilationsstörung, die Ausdruck des fortschreitenden Atemwegsremodellings ist (vgl. Abb. 1.2). Das schwergradig persistierende Asthma bronchiale ist durch einen progredienten Krankheitsverlauf charakterisiert. Es kommt zu in immer kürzeren Abständen auftretenden Asthmaexazerbationen bis hin zum lebensbedrohlichen Status asthmaticus. Diese und interkurrierende respiratorische Infekte machen notärztliche Interventionen und stationäre Krankenhausaufenthalte zur Regel. Das klinische Bild charakterisiert Asthma bronchiale vom Schweregrad IV als eine schwerwiegende, lebensbedrohliche und die Lebensqualität auf Dauer nachhaltig beeinträchtigende Erkrankung (Simon et al. 2003).

1.4 Therapie des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale

Bereits unspezifische Reize, wie Tabakrauch, kalte Luft und Stäube können bei Asthmatikern Symptome auslösen. Die Fortschritte im Verständnis der dem Asthma bronchiale zugrunde liegenden pathogenetischen Vorgänge haben zur Etablierung klar definierter und effektiver Therapieprinzipien geführt. Die Therapie des persistierenden Asthma bronchiale (Schweregrad II – IV) besteht neben allgemeiner Maßnahmen zur Vermeidung auslösender Faktoren grundsätzlich aus mindestens einem Dauermedikament und mindestens einem Bedarfsmedikament (Kroegel 2002). Unabhängig vom aktuellen Beschwerdebild werden Dauermedikamente über einen längeren Zeitraum regelmäßig eingenommen. Sie zielen auf die Reduktion der bronchialen Entzündung und einen verminderten Bronchotonus und dienen damit der Langzeitkontrolle („Controller“) der Erkrankung (Kroegel 2002). Die konsequent anti-entzündliche Behandlung ist die Basistherapie des persistierenden Asthma bronchiale. Dabei kommen unter anderem inhalative Steroide oder

Leukotrienrezeptorantagonisten (Montelukast, Zafirlukast) bei den milderen Verlaufsformen sowie systemische Steroide beim schwergradig persistierenden Asthma bronchiale zum Einsatz. Bedarfsmedikamente („Reliever“) werden dagegen in Abhängigkeit vom aktuellen Beschwerdebild zur Beseitigung kurzfristiger asthmatischer Beschwerden sowie drohender Asthmaattacken eingesetzt (Kroegel 2002). Als Bedarfsmedikation kommen inhalative kurz-wirksame β_2 -Mimetika in Form von Dosieraerosolen, ggf. in Kombination mit einem Anticholinergikum, sowie nicht-retardiertes Theophyllin und orale kurz-wirksame β_2 -Mimetika zum Einsatz. Die Behandlung basiert auf einer Stufentherapie abhängig vom Schweregrad und den unter Therapie auftretenden Symptomen (Abb. 1.3).

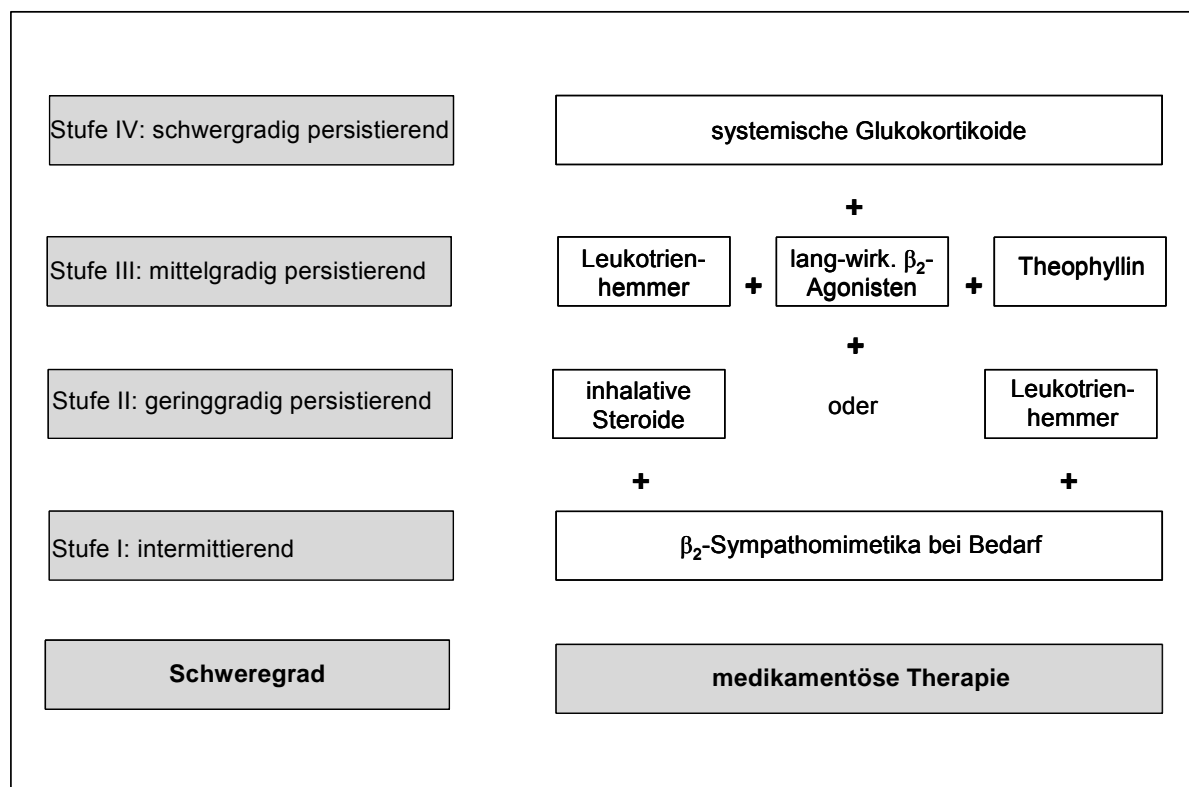


Abbildung 1.3: Aktuelle Therapieprinzipien für die Behandlung des Asthma bronchiale.
Modifiziert nach: Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Asthma, herausgegeben von der Deutschen Atemwegsliga e.V. und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie.

Mit den heute zur Verfügung stehenden Medikamenten ist man in der Lage, die leichteren Formen des Asthma bronchiale (Schweregrade I - III) mit gutem klinischen Effekt zu therapieren und die Erkrankung zu kontrollieren. Demgegenüber sind die Behandlungsmöglichkeiten des schwergradig persistierenden Asthmas weiterhin begrenzt und stellen eine enorme medizinische und auch wirtschaftliche

Herausforderung an Patienten, Ärzte und das Gesundheitssystem dar (Willer und Menz 2003). Eine refraktäre Symptomatik und eine persistierende Atemwegsobstruktion bleiben auch unter der Behandlung mit allen derzeit verfügbaren anti-asthmatischen Medikamenten, einschließlich systemischer Glukokortikoide, bei den Patienten mit einem schwergradig persistierenden Asthma bronchiale bestehen (Kroegel 2002). Die langjährige hochdosierte Glukokortikoiddauertherapie ist, trotz völlig unbefriedigender therapeutischer Einstellung des Asthma bronchiale, für die Patienten mit ernsthaften und irreversiblen Nebenwirkungen verbunden (Simon et al. 2003). Zu ihnen gehören die Hemmung der Nebennierenfunktion assoziiert mit Cushing-Syndrom, arterieller Hypertonie, Gewichtszunahme, Hautatrophie, Diabetes mellitus, Myopathien, Magen-Darm-Ulzera, Steroidakne, Katarakt und Glaukom (Kroegel 2002). Glukokortikoide induzieren myelotoxische Effekte mit opportunistischen Infektionen, beeinflussen den Knochenstoffwechsel und führen so zu Wachstumsstörungen und Osteoporose (Guillevin et al. 1995). Die Zahl und Ausprägung der Nebenwirkungen nimmt dabei parallel zur Therapielänge zu (Kroegel 2002).

Auch der Einsatz von Immunsuppressiva und Zytostatika, wie Cyclophosphamid, Methotrexat oder Cyclosporin, zeigt für den Patienten keine befriedigende und klinisch eindeutig belegbare Wirkung (Evans et al. 2001). Die Erfahrungen mit den genannten Immunsuppressiva sind im Hinblick auf die Beeinflussung des Krankheitsverlaufes enttäuschend und die mit den Medikamenten assoziierten Nebenwirkungen teilweise erheblich (Kroegel 2002).

Trotz aller Fortschritte bei der Behandlung des Asthma bronchiale in den letzten Jahren besteht für die schwerste Verlaufsform eine Behandlungslücke. Daraus resultiert ein großer Bedarf an neuen therapeutischen Strategien, die eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes auf Dauer erzielen und auf den Einsatz systemischer Glukokortikoide oder anderer, mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbundener Medikamente, verzichten können. Auf der Suche nach neuen Behandlungsmöglichkeiten stehen immunmodulatorische Therapieansätze im Vordergrund, die gezielt pathogenetische Entzündungsmechanismen oder spezifische Entzündungsmediatoren blockieren (Kroegel 2002).

2 Ziele der Arbeit

Für die Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale stehen derzeit keine wirksamen Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Daraus resultiert ein hoher Bedarf an neuen medikamentösen Behandlungsansätzen. Aufgrund der dem Asthma bronchiale zugrunde liegenden Pathomechanismen bietet sich die Therapie mit Interferon- α an. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das therapeutische Potenzial von Interferon- α anhand einer patientenbezogenen Studie bei der Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale zu analysieren.

Dabei wird folgenden Fragen nachgegangen:

1. Führt die Behandlung mit Interferon- α zu einer verbesserten Kontrolle des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale?
2. Lassen sich Veränderungen anamnestischer, klinischer und labortechnischer Parameter unter der Interferon- α -Therapie beschreiben?
3. Sind diese Veränderungen mit Modifikationen auf zellulärer Ebene assoziiert (Beeinflussung der Th1/Th2-Imbalance)?
4. Ergeben sich aus den Daten Perspektiven zur Modulation der zugrunde liegenden Prozesse in Hinblick auf eine kausal orientierte Therapieoptimierung?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden

- anamnestische, klinische und labortechnische Parameter nach Studienprotokoll erfasst und ausgewertet sowie
- die Expression von definierten Oberflächenmarkern, von Zytokinen und anderen Mediatoren von Lymphozyten als Vermittler der entzündlichen Reaktion unter Interferon- α -Therapie analysiert.

Aus der Studie sollen Erkenntnisse über die Wirkung von Interferon- α bei der Behandlung des Asthma bronchiale Schweregrad IV gewonnen werden.

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zur Etablierung des Einsatzes von Interferon- α als Therapieoption bei der Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale zu leisten.

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Patienten

3.1.1 Patientencharakteristika

Für die Studie wurden Patienten mit der Exposition schwergradig persistierendes Asthma bronchiale (Schweregrad IV) ausgewählt. Ausschlusskriterien bildeten Raucheranamnese, Einnahme von β -Blockern oder ACE-Hemmern sowie das Vorliegen von Kontraindikationen für Inferax® (Leukozytopenie, Thrombopenie, fortgeschrittene Leberzirrhose, cerebrale Krampfleiden, bestehende Depressionen oder Schwangerschaft). Die Patientenrekrutierung erfolgte über den Zeitraum November 1999 bis Juli 2003. In die Evaluierung wurden 16 Patienten (2 Männer, 14 Frauen; mittleres Alter 49,5 [26 - 68] Jahre) mit einer Erkrankungsdauer im Median von 16 [5 - 24] Jahren zu Therapiebeginn aufgenommen (Tab. 3.1). Die Patienten waren über den Studiencharakter der Untersuchung unterrichtet und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Therapie. Alle Patienten wurden mehrjährig (Dauer ≥ 5 Jahre) hochdosiert mit oralen Glukokortikoiden (20 [5 - 65] mg/d) therapiert. Zusätzlich setzten sie inhalative β_2 -Mimetika als Bedarfsspray ein. Die Patienten klagten über regelmäßige Störungen des Nachtschlafes, Einschränkungen der körperlichen Leistungsfähigkeit und bedurften mindestens einer Notarztbehandlung/Monat. Neben der Grunderkrankung bestanden bei 80 % der Patienten als einer möglichen Folge der jahrelangen, hochdosierten Einnahme von Glukokortikoiden Osteoporose, Katarakt, Diabetes mellitus, Adipositas mit Hypercholesterinämie und/oder Nebennierenrindeninsuffizienz.

Eine Zusammenfassung der wichtigsten Patientendaten ist der Tabelle 3.1 zu entnehmen. Drei Patienten (JP, RH, StK) brachen die Therapie auf Grund von Nebenwirkungen, wie anhaltende Hyperemesis, Fieber und permanente Abgeschlagenheit, ab. Zwei Patienten (SA, SK) wurden wegen Non-Compliance aus der Studie ausgeschlossen. Zwei Patienten (KR, WK) mussten die Therapie aus wirtschaftlichen Gründen abbrechen. Trotz Ansprechen der Patienten auf die Therapie mit IFN- α und Intervention des behandelnden Arztes, waren die zuständigen Krankenkassen nicht zur Übernahme der Behandlungskosten bereit.

Einem Patienten (TP) war es nach dem 6. Therapiemonat durch Wohnortwechsel nicht mehr möglich, die Kontrolltermine wahrzunehmen.

Tabelle 3.1: Charakterisierung der Patienten.

Patient	Alter	Geschlecht	Erstdiagnose Asthma	Abbruchkriterien
AE	64	w	1983	
FH	35	w	1996	
JP	65	m	1997	nach 4 Monaten wegen Nebenwirkungen
KM	44	w	1993	
KE	54	w	1984	
KR	54	w	1987	nach 7 Monaten - keine Kostenübernahme
MD	68	w	1984	
RH	41	w	1989	nach 14 Tagen wegen Nebenwirkungen
SA	34	w	1979	nach 6 Monaten wegen Non-Compliance
SK	40	w	1978	
SE	67	w	1979	
SK	54	m	1978	nach 6 Monaten wegen Non-Compliance
StK	45	w	1997	nach 1 Monat wegen Nebenwirkungen
TP	26	w	1996	Wohnortwechsel (USA)
WK	56	w	1980	nach 2 Monaten – keine Kostenübernahme
ZM	35	w	1993	

Für die Studie konnten insgesamt acht weibliche Patienten (Alter 49 [35 - 68] Jahre) mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale über einen Beobachtungszeitraum von 12 Monaten unter Interferon- α -Therapie betrachtet werden. Für die Zuordnung der Messergebnisse bei der statistischen Auswertung wurden die Symbole entsprechend Tabelle 3.2 verwandt.

Patient	Symbolschlüssel
AE	—■—
FH	—▲—
KM	—●—
KE	—◆—
MD	- - - ■ - - -
SK	- - - ▲ - - -
SE	- - - ● - - -
ZM	- - - ◆ - - -

Tabelle 3.2: Die hier dargestellten Symbole und Linien repräsentieren die ermittelten Daten der jeweiligen Patienten in allen nachfolgenden Abbildungen.

3.1.2 Therapieschema

Die Therapie basierte auf der wöchentlichen subkutanen Gabe von $3 \times 9 \mu\text{g}$ Interferon- α con (Inferax® Yamanouchi, Deutschland). Der Verlauf der Erkrankung ist individuell sehr unterschiedlich, so dass eine Prognose über die Progredienz nicht sicher getroffen werden kann. Daher war die Umstellung auf eine andere Dosierung oder auf ein anderes Interferonpräparat zu jedem Zeitpunkt innerhalb der Studie aus ärztlicher Indikationsstellung und unter Berücksichtigung der Wünsche des Patienten möglich.

Die erste Interferon-Gabe erfolgte unter stationären Bedingungen, um bei eventuell auftretenden Nebenwirkungen, wie Fieber, Übelkeit und Erbrechen, rechtzeitig therapeutisch intervenieren zu können. Darüber hinaus wurden die Patienten mit der subkutanen Applikationsform vertraut gemacht. Alle weiteren Kontrolluntersuchungen fanden in der pneumologischen Ambulanz der Friedrich-Schiller-Universität Jena ambulant statt. Zur Überwachung des Nebenwirkungsprofils von Interferon- α erfolgten regelmäßige Kontrollen des Blutbildes, der Schilddrüsenparameter sowie der Leber- und Nierenwerte. Es wurde festgelegt, die Daten zur Bestimmung des Therapieeffektes zu den Messzeitpunkten, vor Therapiebeginn, nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten Behandlung, zu erheben (Abb. 3.1).

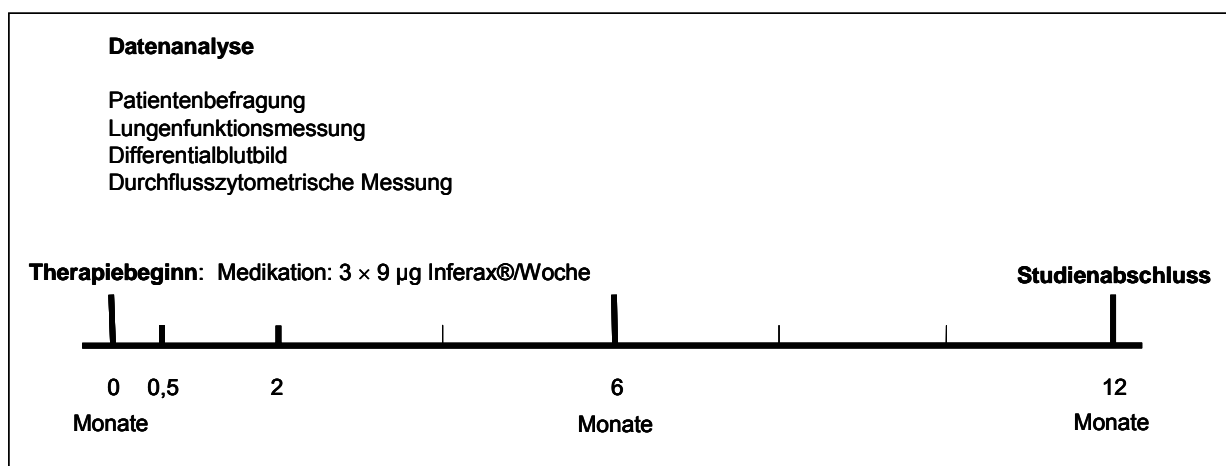


Abbildung 3.1: Schematischer Ablauf der Studie. Zu jedem der angegebenen Zeitpunkte erfolgte die Erfassung von Lungenfunktion und Differentialblutbild sowie die Patientenbefragung mittels Fragebogen.

3.1.3 Patientenfragebogen

Asthma bronchiale ist eine Anfallserkrankung. Daher können zu einem festgelegten Messzeitpunkt objektiv ermittelte Atemflusslimitation und Laborparameter nicht zur alleinigen Beschreibung der Ausprägung und des Verlaufs der Erkrankung herangezogen werden. Die Berücksichtigung der anamnestischen Angaben war somit unerlässlich. Kontrolle und Monitoring des subjektiven Befindens erfolgte mittels Patientenfragebogen. Dieser basiert auf den diagnostischen Kriterien zur Ermittlung des Asthma Schweregrades (vgl. Abs. 1, Tab. 1.2). Dafür wurden Patientenaussagen über

- *Asthmaanfallshäufigkeit/Tag,*
- *Häufigkeit der Bedarfsmedikation/Tag,*
- *Zahl der nächtlichen Dyspnoeanfälle/Woche,*
- *Hustenanfälle/Tag,*
- *Krankenhausaufenthalte/Jahr,*
- *Notarztbesuche/Monat*

zu den festgelegten Messzeitpunkten protokolliert. Zusätzliche Fragestellungen zielten auf die Beschreibung der Veränderung der Symptommhäufigkeit im Alltag und der körperlichen Leistungsfähigkeit der Patienten ab (Tab. 3.3).

Tabelle 3.3: *Fragenspiegel zur Darstellung der körperlichen Leistungsfähigkeit der Patienten.*

1.	<i>Wieviele Treppenstufen können Sie steigen?</i>
2.	<i>Wie lang können Sie spazieren gehen?</i>
3.	<i>Können Sie selbst Einkaufen gehen?</i>
4.	<i>Haben Sie Symptome beim Zähneputzen oder Ankleiden?</i>

Im Rahmen des Asthma-Monitorings der Interferon- α -Therapie zeichneten die Patienten selbstständig mittels Peak-Flow-Meter (PEF-Meter) den maximalen Expirationsfluss in PEF-Protokollen auf. Dabei handelt es sich um eine serielle Lungenfunktionsmessung durch den Patienten, bei der der maximale Fluss während einer forcierten Expiration nach maximaler Einatmung bestimmt wird (Kroegel 2002).

3.1.4 Lungenfunktionsdiagnostik

Eine Lungenfunktionsprüfung gehört zur Basisdiagnostik und ist von besonderer Wertigkeit, da sie die Möglichkeit der diagnostischen Zuordnung von obstruktiver oder restriktiver Ventilationsstörung bietet und dadurch ermöglicht, das Ausmaß der Obstruktion zu objektivieren (Kroegel 2002). Zu den festgelegten Messzeitpunkten, vor Beginn der Studie, nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten Behandlung, erfolgte die Lungenfunktionsprüfung mittels Ganzkörperbodyplethysmographie für die Patienten während des initialen stationären Aufenthaltes und im Rahmen der ambulanten Kontrolluntersuchung. Dabei wurden statische und dynamische Lungenfunktionsparameter erfasst, deren individuelle Sollwerte sich aus Alter, Geschlecht und Körpergröße ableiten (Kroegel 2002).

Tabelle 3.4: *Erfasste Lungenfunktionsparameter.*

Lungenfunktionsparameter *	Einheit
Forcierte Einsekundenkapazität (FEV ₁)	Liter und Prozent vom Soll
Vitalkapazität (VC)	Liter und Prozent vom Soll
Quotient aus FEV ₁ und VC (FEV ₁ /VC)	Prozent und Prozent vom Soll
Totale Lungenkapazität (TLC)	Liter und Prozent vom Soll
Residualvolumen (RV)	Liter und Prozent vom Soll
Atemwegswiderstand (Raw)	kPa/l und Prozent vom Soll

*Diese Angaben wurden als Prozent vom Sollwert der Patienten, ermittelt aus Alter, Geschlecht, Körpergröße und Gewicht, angegeben.

3.2 Materialien

Die nachfolgende Aufstellung gibt die in den durchgeführten Laboruntersuchungen verwendeten Geräte und Substanzen wieder, deren Einsatz im Abschnitt Methoden (3.3) detailliert beschrieben wird.

3.2.1 Geräte

Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Kühlzentrifuge Rotanta 96 RS	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Mikroskop Axiolab	Zeiss, Jena, Deutschland
Vortex-Schüttler	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zytozentrifuge Cytospin 3	Shandon, Pittsburgh, USA

3.2.2 Chemikalien und Biochemikalien

Ammoniumchlorid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Brefeldin A	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
EDTA	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
FCS	Gibco BRL Life Technologies, Rockville, USA
Giemsa	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- Verdünnung der Stammlösung 1:20 mit destilliertem Wasser	
Ionomycin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumbikarbonat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
May-Grünwald	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- Verwendung der Stammlösung	
Natrium-Azid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
PBS	Bio Concept, Allschwill, Schweiz
PMA	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
RPML-1640-Medium	Gibco BRL Life Technologies, Rockville, USA
Saponin	Sigma, Heidelberg, Deutschland
Toluidinblau	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

3.2.3 Antikörper gegen Oberflächenantigene

CD3-FITC	Coulter-Immunotech, Krefeld, Deutschland
CD4-APC	Caltag, Burlingame, CA, USA
CD8-Cy5	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD11b-FITC	Coulter-Immunotech, Krefeld, Deutschland
CD13-PE	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD16-FITC/-PE/-Cy5	Caltag, Burlingame, CA, USA
CD25-FITC/-PE/-Cy5	Caltag, Burlingame, CA, USA
CD27-PE	Caltag, Burlingame, CA, USA
CD44-FITC	Caltag, Burlingame, CA, USA
CD49-FITC	Coulter-Immunotech, Krefeld, Deutschland
CD69-PE	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD95-PE	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
CD95L-FITC	Anall, Bayport, MN, USA

CD103-FITC	Caltag, Burlingame, CA, USA
CD116-PE	Coulter-Immunotech, Krefeld, Deutschland
CD125-PE	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
HLA-DR-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

3.2.4 Zytokin-Antikörper

Anti-IFN- γ -mAk-PE	BD-Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-IL-2-mAk-PE	BD-Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-IL-4-mAk-PE	BD-Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-IL-5-mAk-PE	BD-Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-IL-10-mAk-PE	BD-Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-TNF- α -mAk-PE	BD-Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

3.2.5 Verwendete Software

Excel 2003 für Windows, 2003, USA
 FACS-Auswertungssoftware CellQuest Version 3.1, 1997, USA
 SPSS 10.0 für Windows, 1999, USA

3.3 Methoden

3.3.1 Differentialblutbild

Die Anzahl und Verteilung der Blutzellen sowie deren Subpopulationen wurden mittels eines Standardhämatometers zu den einzelnen Messzeitpunkten bestimmt. Die zytologische Auswertung der Blutzellen erfolgte nach Zytozentrifugation und anschließender Färbung (May-Grünwald-Giemsa-Färbung) per Hand unter einem elektronischen Lichtmikroskop (Zeiss, Axiolab, Jena, Deutschland). Dabei wurde der relative Anteil der Leukozyten-Subpopulationen aufgrund einer differentiellen Auswertung von 200 Zellen unter dem Lichtmikroskop von einem erfahrenen Zytologen ausgezählt.

Zur Kontrolle der Schilddrüsenfunktion unter Interferon- α -Therapie wurden die Parameter TSH, T3 gesamt und freies T4 bestimmt. Weiterhin erfolgte die Kontrolle der Leberwerte γ -GT und LDH, des Pankreashormons Lipase sowie des C-reaktiven Proteins (CRP) und der Blutkörperchensenkgeschwindigkeit als Entzündungsmarker. Die genannten Laborparameter sowie die elektrophoretische Auftrennung der

Proteinfractionen (α -, β -, γ -Globulin) wurden im Routinelabor der Friedrich-Schiller-Universität Jena ermittelt.

3.3.2 Durchflusszytometrie

3.3.2.1 Durchflusszytometrische Analyse von Zelloberflächenantigenen

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Messung ist es möglich, Zellpopulationen hinsichtlich mehrerer physikalischer Eigenschaften der beteiligten Einzelzellen zu analysieren. Dies erlaubt eine exakte Unterscheidung sowie Phänotypisierung der Zellen. Die Durchflusszytometrie liefert Informationen bezüglich Größe, Granularität sowie Fluoreszenzintensität für jede Zelle. Die zur Markierung der Zellen verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind an monoklonale Antikörper, die gegen die zu untersuchenden Oberflächenantigene gerichtet sind, gebunden (Abb. 3.2).

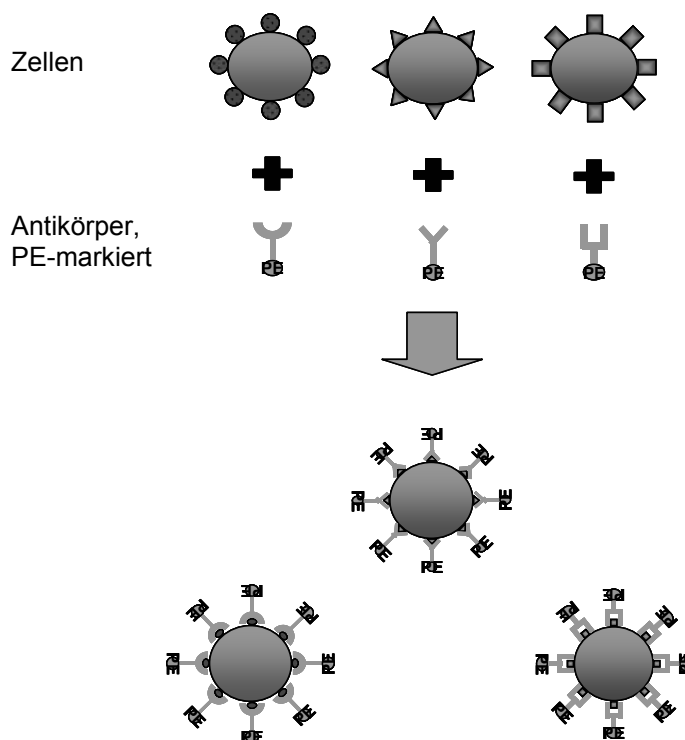


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Zellmarkierung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Die fluoreszenzmarkierten Antikörper binden an die nachzuweisenden Oberflächenantigene der Zellen. Dieser Komplex aus Zelle und Antikörper kann im FACS-Gerät gemessen werden.

Die so markierten Zellen werden im Durchflusszytometer in einer dünnen Kapillare angesaugt, so dass ein Strom einzelner Zellen entsteht, der mit einem Laserlicht der Wellenlänge von 488 nm bzw. 635 nm in Kontakt tritt. Über Photodetektoren erfolgt die Messung des Vorwärtstreulichtes als Maß für die Zellgröße und des Seitwärtstreulichtes als Maß für die Granularität sowie die Erfassung der emittierten

Fluoreszenzintensität, die ein Korrelat der zellulären Bindungsstellen des entsprechenden Oberflächenantigens darstellt. Nach dem Messvorgang können die gespeicherten Daten mit einer speziellen FACS-Software ausgewertet werden. Mit dem verwendeten Durchflusszytometer war die gleichzeitige Messung auf vier verschiedenen Fluoreszenzen (4-Farben-Technik) möglich: Fluoresceinisothiocyanat (FITC) emittiert grünes Licht der Wellenlänge 519 nm, Phycoerythrin (PE) gelbes Licht von 578 nm, Cytochrom 5-PE (Cy5-PE) rotes Licht von 617 nm und Allophycocyanin (APC) rotes Licht von 667 nm.

Für die direkte Immunfluoreszenz wurde nach einem Standardprotokoll des Becton-Dickinson Monoclonal Center (Mountain View, CA) gearbeitet. Dabei wurden 100 µl des EDTA-Blutes mit einer sättigenden Konzentration FITC-, PE-, PE-Cy5- oder APC-konjugierter monoklonaler Antikörper für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Eliminierung der Erythrozyten erfolgte mittels 3 ml einer Lysierungs-Lösung (8,3 g Ammoniumchlorid, 1,0 g Kaliumbikarbonat, 35,8 mg EDTA pro Liter destilliertes Wasser, pH 7,2) für 3 – 5 Minuten. Die Leukozyten wurden zweimal mit Phosphat-Puffer-Lösung PBS/2 % FCS und 0,1 % Natrium-Azid gewaschen. Anschließend erfolgte die Messung am Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Zur Auswertung wurden die Zellen nach ihrem Streulichtverhalten getrennt. Im so genannten „forward scatter“/„side scatter“-Diagramm wurden sie anhand von Größe, Granularität und Oberflächeneigenschaften, wie in Abbildung 3.3 gezeigt, voneinander differenziert.

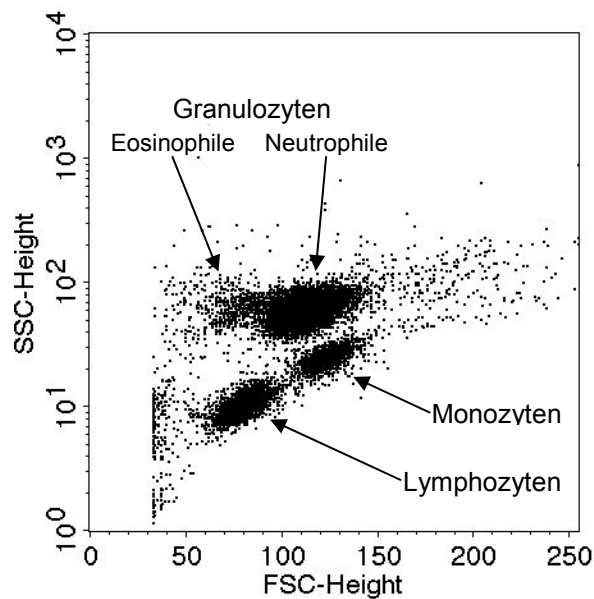


Abbildung 3.3: Scatterdiagramm zur Differenzierung der Leukozyten. In diesem Punktediagramm sind die ausgezählten Zellen als Punkte (dimensionslos) dargestellt. Es wurden 10.000 Zellen gezählt. Das Scatterdiagramm zeigt das unterschiedliche Streulichtverhalten der verschiedenen Zellpopulationen.

Nach Selektion der Lymphozyten durch entsprechendes Setzen und Verknüpfen der gewünschten Regionen („gating“) werden diese nach dem Fluoreszenzverhalten der gebundenen monoklonalen Antikörper unterteilt (Schumann 2003). Die Anzahl der immunfluoreszenz-positiven Zellen (von 10.000 analysierten Zellen) wurde mittels Becton-Dickinson CellQuest Pro[®] Software bestimmt. Die Kontrolle der Spezifität der Antikörperbindung erfolgte durch die Färbung mit isotypengleichen Mausimmunglobulinen. Die monoklonalen Antikörper gegen CD3⁺ (T-Zellen), CD4⁺ (T-Helferzellen), CD8⁺ (T-Suppressorzellen/zytotoxische Zellen), γ/δ -T-Zellen, HLA-DR, VLA-1, VLA-2, CD25, CD27, CD28, CD45RO, CD62L, CD69, CD95, CD95L, CD103 (α_E -Integrin), stammen von der Firma Caltag (Hamburg, Deutschland).

Für die Analyse der Bluteosinophilen wurden der Neutrophilenmarker CD16 (FITC- oder PE-Cy5-konjugiert) zusätzlich zu FITC-, PE- bzw. PE-Cy5-konjugierten Antikörpern gegen CD11b, CD13, CD27, CD44, CD49, CD69, CD95, CD95L, CD116, CD125 und HLA-DR (Caltag, Hamburg, Deutschland) zugegeben und die Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Die Expression von Oberflächenantigenen auf Eosinophilen wurde ebenfalls durch entsprechendes Setzen von Regionen ermittelt.

3.3.2.2 Analyse der Zytokinproduktion mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie

Für die intrazelluläre Färbung wurden periphere Blutzellen in Lithium-Heparin-Röhrchen abgenommen. 100 μ l des Blutes wurden zu 890 μ l RPMI-1640-Medium

und 10 µl einer Mischung aus Brefeldin A (Endkonzentration 5 µg/ml), Ionomycin (1 µg/ml) und PMA (10^{-9} M) (alle Bestandteile: Sigma, Taufkirchen, Deutschland) zugegeben und bei 37° C für 4 Stunden inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Erythrozytenlyse durch Ammoniumchlorid. Nach dem Waschen mit PBS/2 %FCS erfolgte die intrazelluläre Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD3 (Coulter-Immunotech, Krefeld, Deutschland), CD4 (Caltag, Hamburg, Deutschland) und CD8 (BD-Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS/2 %FCS wurden die Zellen mit 100 µl einer 2%igen Paraformaldehydlösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 100 µl Permeabilisierungslösung (0,1 % Saponin und 0,1 % NaN_3 in PBS) zusammen mit 1 µl direkt konjugierten Anti-Zytokin-Antikörpern (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ und TNF- α , alle von BD-Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit der Permeabilisierungslösung wurden die Zellen in PBS/2 % FCS resuspendiert und die Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) erfasst. Für die Analyse wurden die Lymphozytenpopulationen durch entsprechendes Setzen von Regionen definiert. Für die Datenerfassung kam CellQuest Pro[®] Software zum Einsatz.

3.3.3 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mittels der Softwareprogramme Excel 2003 und SPSS 10.0 für Windows. In den Abbildungen sowie im Text sind die Messwerte als Median, der wegen der kleinen Stichprobenumfänge gewählt wurde, dargestellt. Im Text werden zusätzlich Minimum und Maximum (range) angegeben. Die Beschreibung der Streuung erfolgt in den Abbildungen durch den Interquartileabstand. Für die Berechnung von Unterschieden innerhalb der Patientengruppe wurde der Wilcoxon-Test für verbundene, nicht-normalverteilte Stichproben gewählt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Effekte der Interferon- α -Therapie

Die Therapie basierte auf der wöchentlichen subkutanen Gabe von $3 \times 9 \mu\text{g}$ Interferon- α . Die erste Interferon-Gabe erfolgte unter stationären Bedingungen, alle weiteren Kontrolluntersuchungen fanden ambulant statt. Die Daten wurden zur Bestimmung des Therapieeffektes zu den Messzeitpunkten, vor Therapiebeginn, nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten Behandlung, erhoben

4.1.1 Subjektives Befinden

Grundlage für die Bewertung der Veränderung des subjektiven Befindens unter IFN- α -Therapie bildeten die mittels Fragebogen zu den oben benannten Messzeitpunkten erfassten Angaben der Patienten. Die Auswertung erfolgte nach den Kriterien:

1. ärztliche Interventionen,
2. Häufigkeit von Symptomen und Exazerbationen,
3. körperliche Belastbarkeit.

Bei den Patienten konnte ein signifikanter Rückgang der Krankenhausaufenthalte von 4,0 [1,0 - 8,0] auf 0,0 [0,0 - 3,0] pro Jahr im Therapiezeitraum von 12 Monaten verzeichnet werden ($p < 0,05$). Bei 75% der Patienten war nach Therapieeinleitung keine stationäre Behandlung mehr aufgrund von Exazerbationen im Betrachtungszeitraum erforderlich (Abb. 4.1A). Auch für die verbleibenden 25 % der Asthmatiker war die Anzahl der erforderlichen Krankenhausaufenthalte pro Jahr rückläufig. In gleicher Weise veränderte sich die Anzahl der Notarztbesuche pro Monat (Abb. 4.1B). Diese nahm signifikant von 6,5 [2,0 - 15,0] auf 0,0 [2,0 - 5,0] Notarztbesuche pro Monat ($p < 0,05$) ab. Nach 12 Monaten konnten unter Interferon- α -Therapie 75 % der Patienten vollständig auf Notarztbesuche verzichten. Auch für die Häufigkeit von Asthmaattacken ließ sich eine signifikante Abnahme von 6 [2 - 10] auf 0 [0 - 3] pro Tag ($p < 0,05$) unter Interferon- α -Therapie nach 12 Monaten nachweisen (Abb. 4.1C). Übereinstimmend gaben alle Patienten unter Interferon- α -Therapie zudem eine deutliche Verbesserung des Nachtschlafes an. Die

Zahl nächtlicher Dyspnoeanfälle mit Unterbrechung des Nachtschlafes sank signifikant von 11,0 [4,0 - 30,0] auf 0,5 [0,0 - 3,0] pro Monat (Abb. 4.1D).

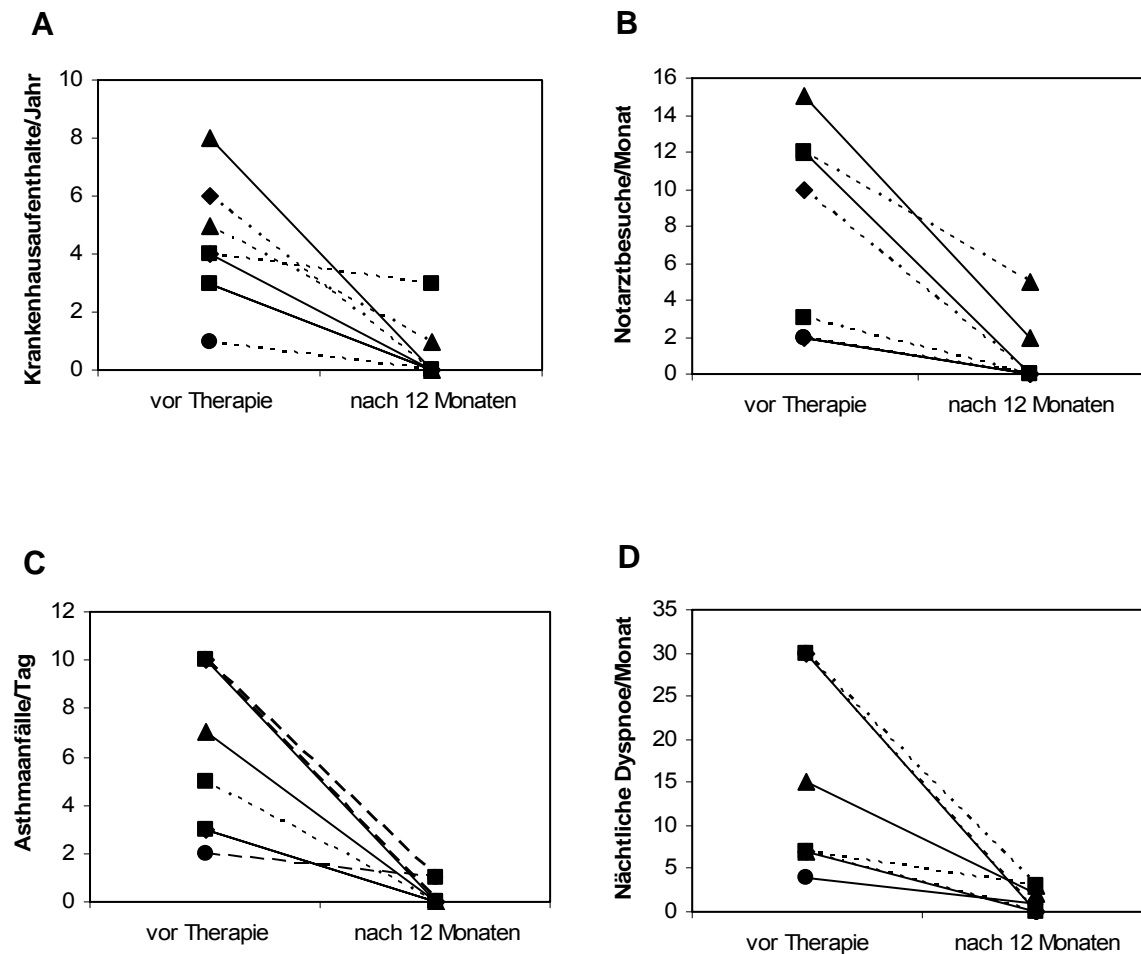


Abbildung 4.1: Vergleich der Häufigkeit ärztlicher Interventionen und Symptome vor und nach 12 Monaten Behandlung mit IFN- α bei Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale. Es wurde die Anzahl der Krankenhausaufenthalte/Jahr (**A**), die Anzahl der Notfallbehandlungen/Monat (**B**), die Asthmaanfallshäufigkeit/Tag (**C**) sowie die Anzahl nächtlicher Dyspnoeanfälle/Monat (**D**) für Patienten ($n = 8$) mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale aus dem Patientenfragebogen ermittelt.

Die nicht quantifizierbaren Patientenaussagen über die Symptommhäufigkeit bei den täglichen Verrichtungen, wie Zähneputzen, Ankleiden, Treppensteigen und Spaziergehen, wurden semiquantitativ bewertet und sind in der Tabelle 4.1 zusammengefasst. Sie repräsentieren die Selbsteinschätzung der Patienten hinsichtlich ihrer körperlichen Belastbarkeit nach 12 Monaten Interferon- α -Therapie.

Tabelle 4.1: Semiquantitative Bewertung der körperlichen Belastbarkeit. Die Angaben wurden nach 12 Monaten IFN- α -Therapie mit Hilfe der Patientenfragebögen ermittelt.

Patient	Symptome bei körperlicher Belastung				
	Treppensteigen	Spazieren-gehen	Einkaufen	Zähneputzen	Ankleiden
AE	+++	+++	++	+++	+++
FH	+++	+++	++	+++	+++
KM	+++	+++	+++	+++	+++
KE	+	++	+	+++	++
MD	+++	+++	+++	+++	+++
SK	+	++	+	+	+
SE	++	++	++	++	++
ZM	++	+++	++	++	++

Legende: +++ = sehr stark verringert + = verringert
 ++ = stark verringert +/- = unverändert

In der Tabelle 4.2 sind die Peak-Flow-Bestwerte der Patienten (n = 8) in l/min vor Therapie den Bestwerten unter IFN- α -Therapie gegenübergestellt. Der Peak-Flow repräsentiert in erster Linie die Obstruktion der größeren Atemwege (Kroegel 2002). Auf der Grundlage der Asthma-Tagebücher der Patienten wurde der PEF-Bestwert in l/min vor und unter Therapie ermittelt. Dabei kam es unter der Behandlung mit Interferon- α zu einer signifikanten Zunahme des Peak-Flow im Median um 25 % von 300 [100 - 350] l/min auf 375 [200 - 430] l/min.

Patient	PEF-Bestwert [l/min]		
	Vor Therapie	Unter Therapie	Differenz
AE	340	430	90
FH	300	400	100
KM	150	340	190
KE	300	400	100
MD	300	350	50
SK	100	250	150
SE	150	200	50
ZM	350	400	50
Median	300 [100 - 350]	375 [200 - 430]	95 [50 - 190]

Tabelle 4.2: Peak-Flow-Veränderung unter Interferon- α -Therapie. Dargestellt sind die PEF-Bestwerte in l/min vor Therapie, unter Therapie sowie die Differenz der PEF-Bestwerte. Zusätzlich sind Median und range ausgewiesen. Die Daten wurden auf Grundlage der Asthma-Tagebücher und Patientenfragebögen für 8 Asthmatiker ermittelt.

4.1.2 Entwicklung der Lungenfunktion unter Interferon- α -Therapie

4.1.2.1 Forcierte Einsekundenkapazität

Die bodyplethysmographische Bestimmung der Lungenfunktion zu den Messzeitpunkten, vor Therapiebeginn, 2 Wochen, 2 Monate, 6 Monate und 12 Monate nach Therapieeinleitung, diente der objektiven Kontrolle des Therapieerfolges anhand etablierter Parameter, wie der forcierten Einsekundenkapazität (FEV_1), der Vitalkapazität (VC), dem Quotienten aus FEV_1 und VC (FEV_1/VC), des Residualvolumens (RV) und des Atemwegswiderstandes (Raw). Die Ganzkörperbodyplethysmographie wurde von einem erfahrenen Pneumologen bewertet.

Bei der forcierten Einsekundenkapazität oder dem forcierten expiratorischen Volumen der ersten Sekunde (FEV_1) handelt es sich um einen dynamischen Lungenfunktionsparameter, mit dessen Hilfe man Rückschlüsse über die bestehende Obstruktion der Atemwege ziehen kann (Kroegel 2002). Für vier Patienten konnte eine kontinuierliche Verbesserung und Stabilisierung der FEV_1 -Werte über den gesamten Therapiezeitraum verzeichnet werden. Davon erreichten zwei Patienten nach 12 Monaten Interferon- α -Therapie FEV_1 -Werte von über 100 %. Die verbleibenden zwei Patienten erzielten Verbesserungen der FEV_1 von 30 %. Ein Patient mit einer sehr stark eingeschränkten Ausgangs- FEV_1 (31,0 %) zeigte im Verlauf variable FEV_1 -Werte zwischen 41 % und 73 %. Bei drei Patienten nahm die FEV_1 gegenüber dem Ausgangsniveau leicht ab. Diese drei Patienten (KM, SK, SE) wiesen zum Messzeitpunkt 12 Monate einen bronchopulmonalen Infekt auf (Abb. 4.2A). Der Vergleich der Mediane der forcierten Einsekundenkapazität vor Therapiebeginn und nach 12-monatiger Behandlung zeigt eine markante Steigerung der FEV_1 -Werte von 64,2 % [31,4 - 90,8] auf 75,4 % [41,5 - 108,2] unter Interferon- α -Behandlung (Abb. 4.2B). Für diese Steigerung ließ sich jedoch keine statistische Signifikanz errechnen.

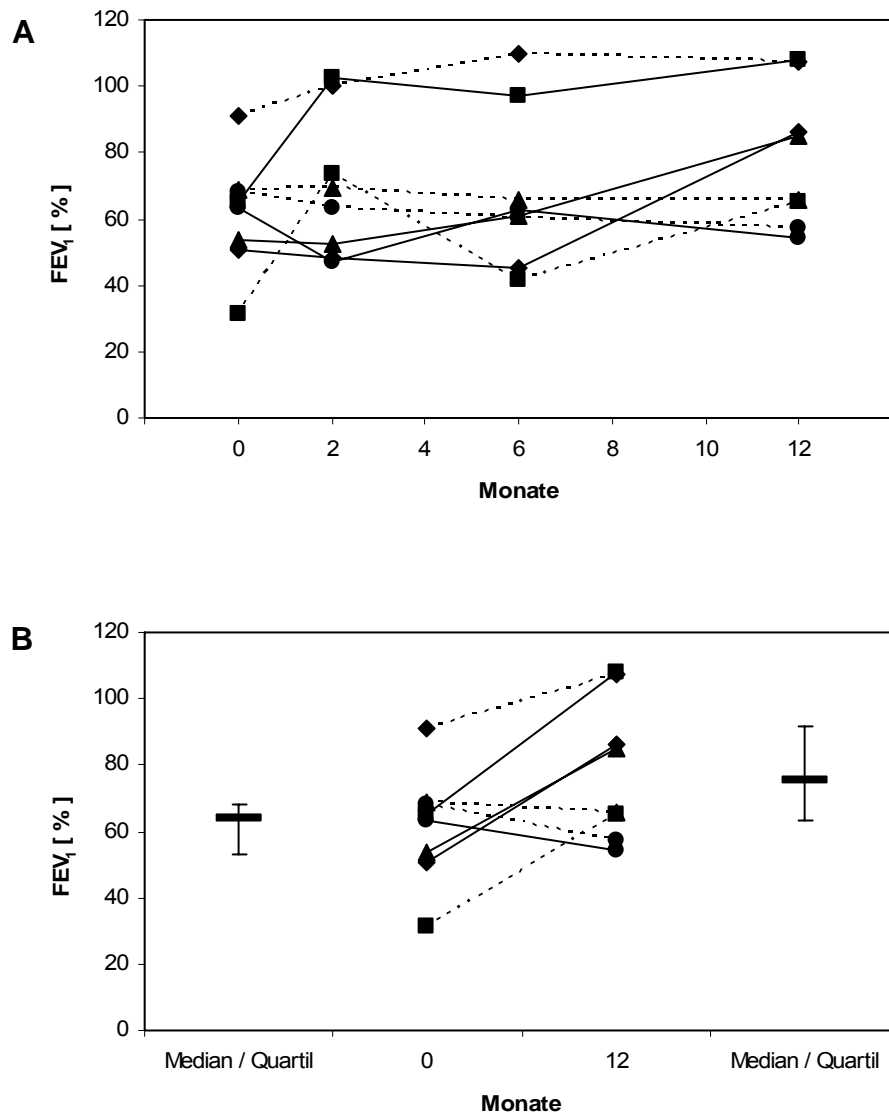


Abbildung 4.2: Veränderung der forcierten Einsekundenkapazität (FEV₁) unter IFN- α -Therapie. Dargestellt ist die zeitliche Entwicklung der FEV₁ zu den Messzeitpunkten vor Therapie, 2 Monate, 6 Monate und 12 Monate nach Therapiebeginn (**A**). Abgebildet ist der direkte Vergleich der FEV₁-Einzelwerte vor Therapiebeginn und nach 12 Monaten Behandlung. Zusätzlich sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für die beiden Messzeitpunkte angegeben (**B**). Die forcierte Einsekundenkapazität (FEV₁) wurde bodyplethysmographisch bestimmt. Die Daten sind in Prozent des Sollwertes für 8 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale angegeben.

4.1.2.2 Quotient aus FEV₁ und VC

Bei dem Quotienten aus forcierter Einsekundenkapazität und Vitalkapazität, dem sogenannten Tiffenau-Index, handelt es sich um einen Parameter, der gut mit dem Grad der obstruktiven Ventilationsstörung korreliert. Bei fünf Patienten stieg der Tiffenau-Index unter IFN- α -Therapie kontinuierlich an (Abb. 4.3A). Bei diesen Patienten war eine 7 - 20%ige Verbesserung des Tiffenau-Indexes zu beobachten. Zwei Patienten (AE, SK), mit fast normalen FEV₁/VC-Quotienten vor Therapie

(96,0 % und 91,6 %), zeigten unter Therapie keine eindeutigen Änderungen (94,0 % und 93,7 % nach 12 Monaten Behandlung). Nur bei einem Patienten (SE) verschlechterte sich das Verhältnis von FEV₁ zu VC unter Therapie von 80,0 % auf 73,0 %. Aus der Darstellung der Mediane des Tiffenau-Indexes (Abb. 4.3B) lässt sich eine ansteigende Tendenz ableiten. Eine statistische Signifikanz konnte für diese Veränderung von 76,7 % [58,0 - 96,0] auf 89,1 % [65,1 - 94,0] jedoch nicht errechnet werden ($p > 0,05$).

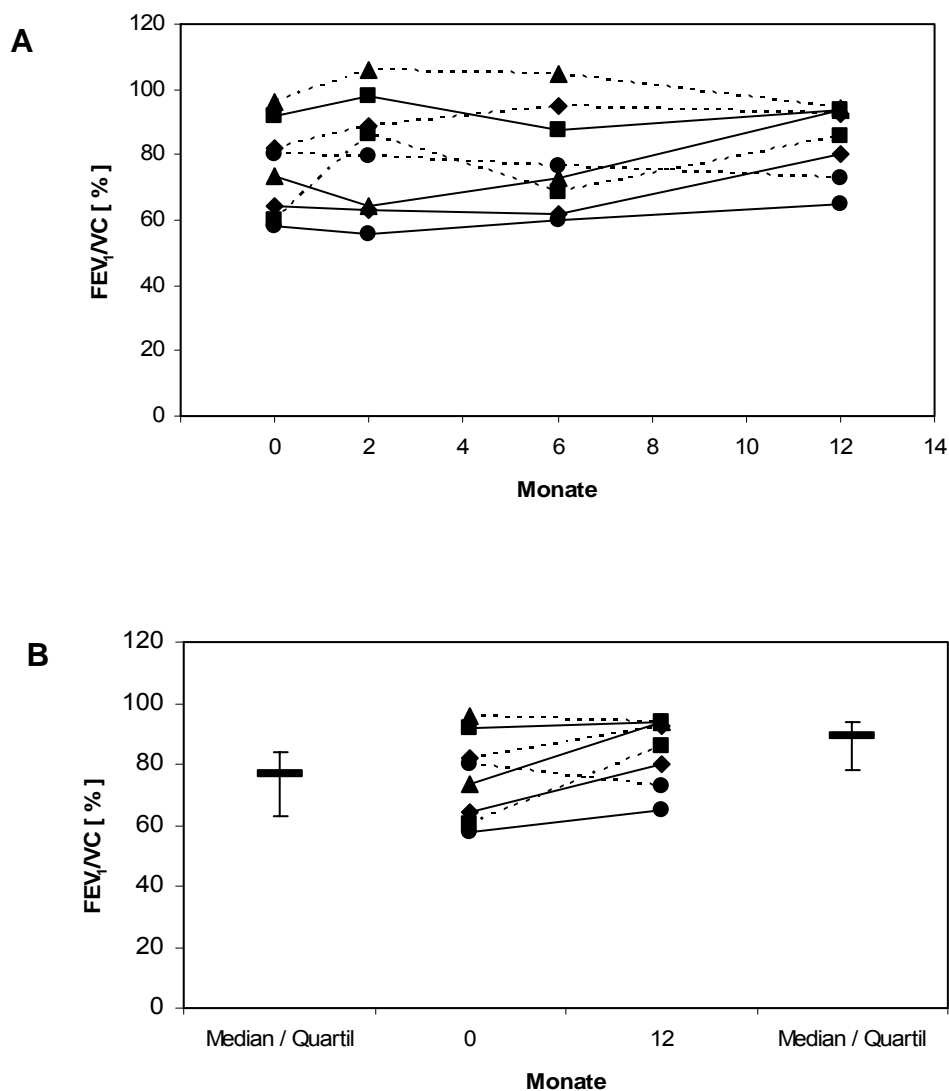


Abbildung 4.3: Entwicklung des FEV₁/VC-Quotienten unter Therapie mit Interferon- α . Dargestellt ist die zeitliche Veränderung des Quotienten aus FEV₁ und VC über den Therapiezeitraum von 12 Monaten (**A**). Direkt gegenübergestellt wurde der FEV₁/VC-Quotient vor Therapiebeginn und nach 12-monatiger Behandlung. Zusätzlich sind der Median und die 25 - 75%-Quartile der Messzeitpunkte vor Therapiebeginn und nach 12 Monaten Behandlung eingetragen (**B**). Die Messwerte wurden mittels Bodyplethysmographie für 8 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale bestimmt. Die Daten sind in Prozent des Sollwertes angegeben.

4.1.2.3 Residualvolumen

Das Residualvolumen (RV) gibt das nach maximaler Expiration noch in der Lunge verbleibende, nicht mobilisierbare Gasvolumen an. Es ist damit ein geeignetes diagnostisches Kriterium für das Vorliegen einer obstruktiven Ventilationsstörung. Die Bestimmung des Residualvolumens ergab für die Patienten ($n = 8$) einen Rückgang von 153,0 % [88,0 - 164,3] vor Therapieeinleitung auf 129,4 % [84,9 - 203,9] nach 12 Monaten IFN- α -Behandlung (Abb. 4.4), der sich statistisch als nicht signifikant erwies. Bei zwei Patienten (KM, SE) war zum Messzeitpunkt 12 Monate eine geringe Zunahme des Residualvolumens zu verzeichnen, wobei in beiden Fällen eine Infektexazerbation bestand.

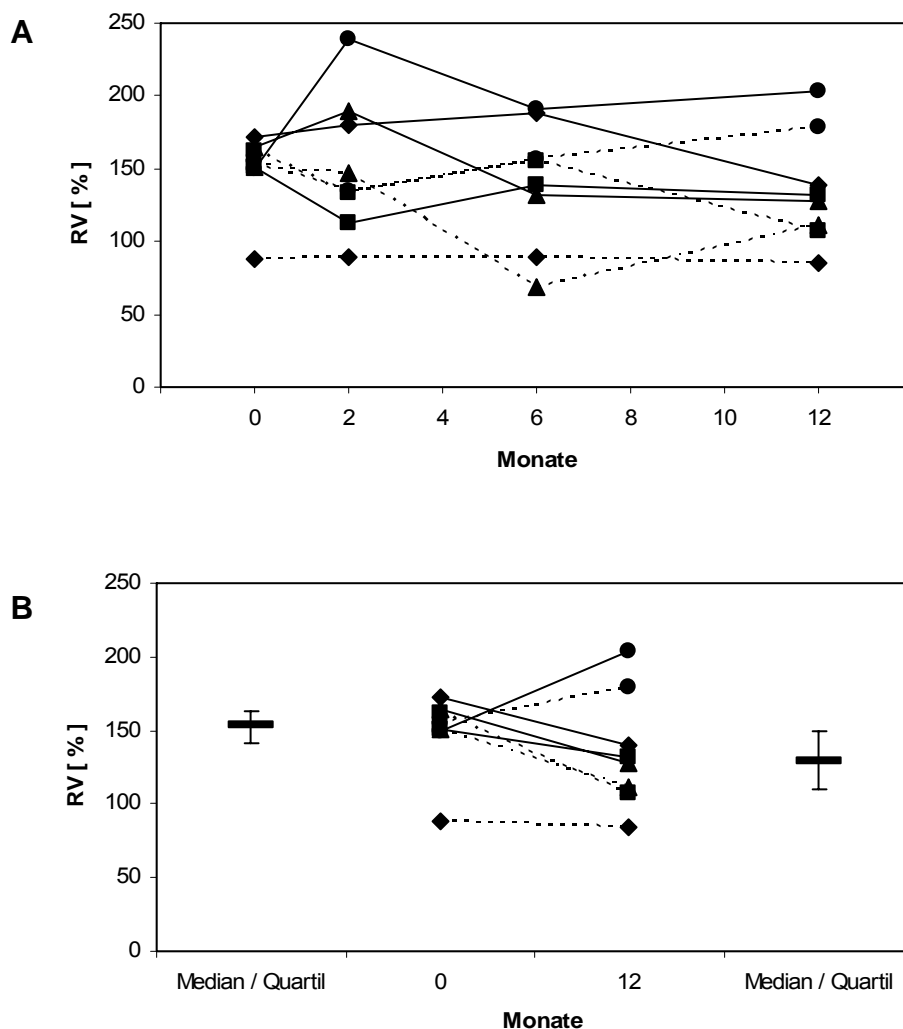


Abbildung 4.4: Veränderung des Residualvolumens (RV) unter IFN- α -Therapie. Dargestellt ist die zeitliche Veränderung des Residualvolumens vor und nach 12-monatiger IFN- α -Behandlung (A). Die Abbildung zeigt den direkten Vergleich der RV-Einzelwerte vor Therapiebeginn und nach 12-monatiger Therapie. Weiterhin sind der Median und die 25-75%-Quartile für die beiden Messzeitpunkte eingetragen (B). Die Daten wurden mittels Bodyplethysmographie für 8 Asthmatiker erfasst und sind in Prozent des Sollwertes angegeben.

4.1.2.4 Atemwegswiderstand

Die beim Asthma bronchiale bestehende Atemwegsobstruktion korreliert positiv mit dem bodyplethysmographisch ermittelten Atemwegswiderstand (Raw). Die Messung des Atemwegswiderstandes unter der Interferon- α -Therapie erbrachte eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Reduktion von 193,7 % [102,0 - 497,6] vor Therapiebeginn auf 111,6 % [67,3 - 356,5] nach 12 Monaten IFN- α -Behandlung. Nur ein Patient (SE) zeigte eine Zunahme des Atemwegswiderstandes von 102,0 % auf 356,5 % (Abb. 4.5). Der Patient wies zum Zeitpunkt der Vorstellung eine Infektexazerbation auf.

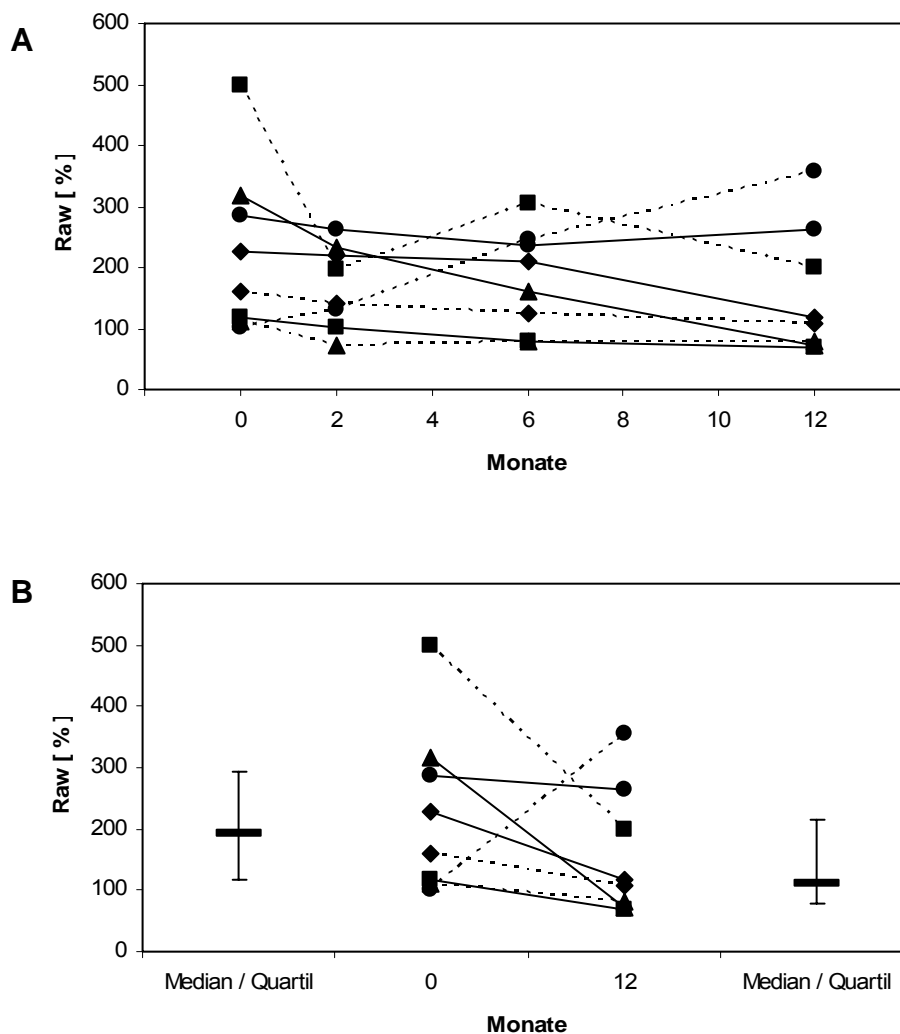


Abbildung 4.5: Veränderung des Atemwegswiderstandes (Raw) unter IFN- α -Therapie. Dargestellt ist die zeitliche Veränderung des Raw über den Behandlungszeitraum von 12 Monaten (A). Die Abbildung zeigt den direkten Vergleich der Raw-Einzelwerte vor Therapiebeginn und nach 12 Monaten IFN- α -Behandlung. Zusätzlich sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für die beiden Messzeitpunkte angegeben (B). Die Messwerte wurden mittels Bodyplethysmographie ermittelt. Die Daten wurden für 8 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale erfasst und sind in Prozent des Sollwertes dargestellt.

4.2 Pharmakologische Effekte der Interferon- α -Therapie

4.2.1 Glukokortikoidtherapie

Ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Studie bestand in der Beantwortung der Frage, ob sich unter der Therapie mit Interferon- α die tägliche Dosis der oralen Kortikosteroide reduzieren lässt. Vor Therapiebeginn betrug der Median der oralen Glukokortikoiddosis 17,5 [5,0 - 64,0] mg/d. Unter Therapie konnte eine signifikante Reduktion des Einsatzes von Glukokortikoiden erfolgen ($p < 0,05$). Nach 12 Monaten Therapie lag die orale Glukokortikoiddosis bei 2,0 [0,0 - 16,0] mg/d. Bei fünf Patienten (AE, FH, KE, SE, ZM) war es innerhalb des Studienzeitraumes möglich, die orale Glukokortikoidtherapie zu beenden (Abb. 4.6). Ein Patient (MD) konnte die Glukokortikoiddosis auf ein Drittel seiner Ausgangsmenge und ein weiterer Patient (KM) auf ein Viertel seiner Dosierung vor Therapiebeginn senken. Patient SK konnte während der Interferon- α -Behandlung nicht über den gesamten Therapiezeitraum von 12 Monaten auf die Einnahme von Glukokortikoiden verzichten. Es war ihm jedoch unter der IFN- α -Therapie möglich, über einen Zeitraum von 10 Monaten eine kontinuierliche Dosisreduktion von 64,0 mg/d auf 16,0 mg/d zu erreichen. Zusätzlich gelang es dem Patienten erstmals in 22 Jahren, das orale Glukokortikoid über einen Zeitraum von 3 Monaten ganz abzusetzen.

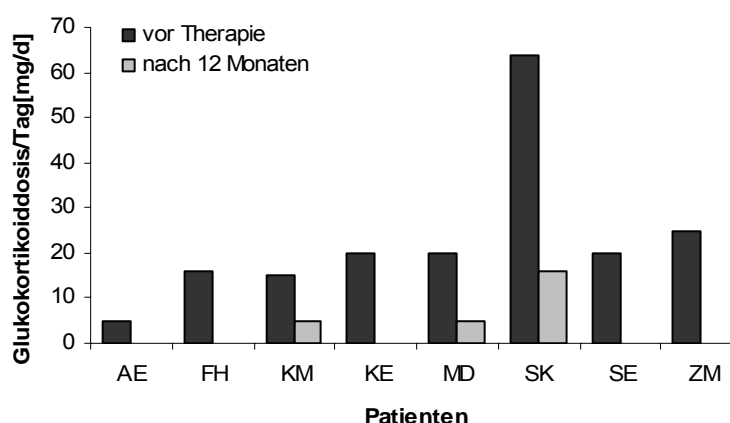


Abbildung 4.6: Direkter Vergleich der oralen Glukokortikoideinnahme vor Therapiebeginn und nach 12-monatiger Interferon- α -Therapie. Die orale Glukokortikoiddosis ist in mg/d von 8 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale dargestellt. Die Daten wurden anhand der Krankenakte der Patienten und des Patientenfragebogens ermittelt.

4.2.2 Einsatz von β_2 -Mimetika

Die Aussagen der Patienten zum Gebrauch von kurz-wirksamen β_2 -Mimetika-Inhalationen ergaben in der statistischen Auswertung einen signifikanten Rückgang des Einsatzes von 10,0 [2,0 - 20,0] Hübe/Tag vor Therapie auf 1,0 [0 - 3] Hübe/Tag zum Kontrolltermin 12 Monate ($p < 0,05$). Selbst Patienten (KM, KE), die vor Therapiebeginn einen sehr hohen Einsatz an bronchodilatierendem Bedarfsspray angaben (> 15 Hübe/Tag), reduzierten diesen unter der Interferon- α -Therapie auf < 5 Hübe/Tag nach 12 Behandlungsmonaten (Abb. 4.7).

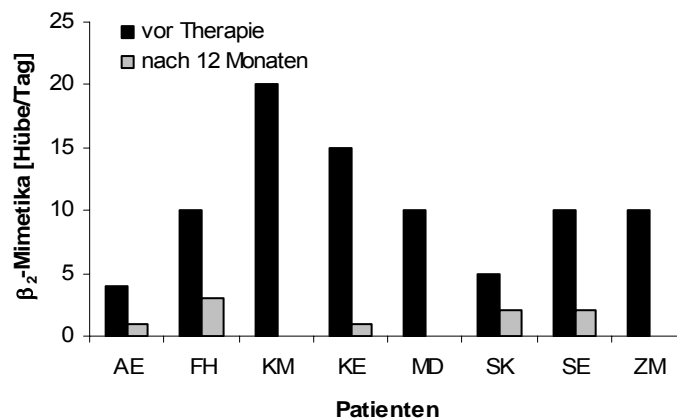


Abbildung 4.7: Direkter Vergleich des Einsatzes inhalativer β_2 -Mimetika vor Therapiebeginn und nach 12-monatiger Interferon- α -Therapie. Die Bedarfsmedikation ist in Hübe/Tag von 8 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale dargestellt. Die Daten wurden mittels Patientenfragebogens erhoben.

4.3 Immunologische Effekte der Interferon- α -Therapie

4.3.1 Zahl der eosinophilen Granulozyten

Die Eosinophilenzellzahl, im Blut ebenso wie im Gewebe, ist ein grober Marker für die Aktivität, aber auch für das Ausmaß der Organmanifestation allergisch-entzündlicher Erkrankungen. Dabei wird dem Eosinophilen ein besonderer Einfluss bei der Entwicklung des Atemwegsremodellings zugeschrieben (Kroegel 2002). Bis zum 6. Therapiemonat war eine Reduktion der Bluteosinophilenzellzahl im Median von 0,46 [0,05 - 0,74] Gpt/l auf 0,18 [0 - 0,41] Gpt/l nachweisbar. Danach stieg die Bluteosinophilenzellzahl bei allen Patienten ($n = 8$) wieder an. Nach 12-monatiger IFN- α -Therapie lag der Median bei 0,28 [0,06 - 0,99] Gpt/l. Dies entspricht einer nicht

signifikanten Abnahme der Eosinophilenzellzahl um 39,1 % gegenüber dem Median vor Therapie (Abb. 4.8).

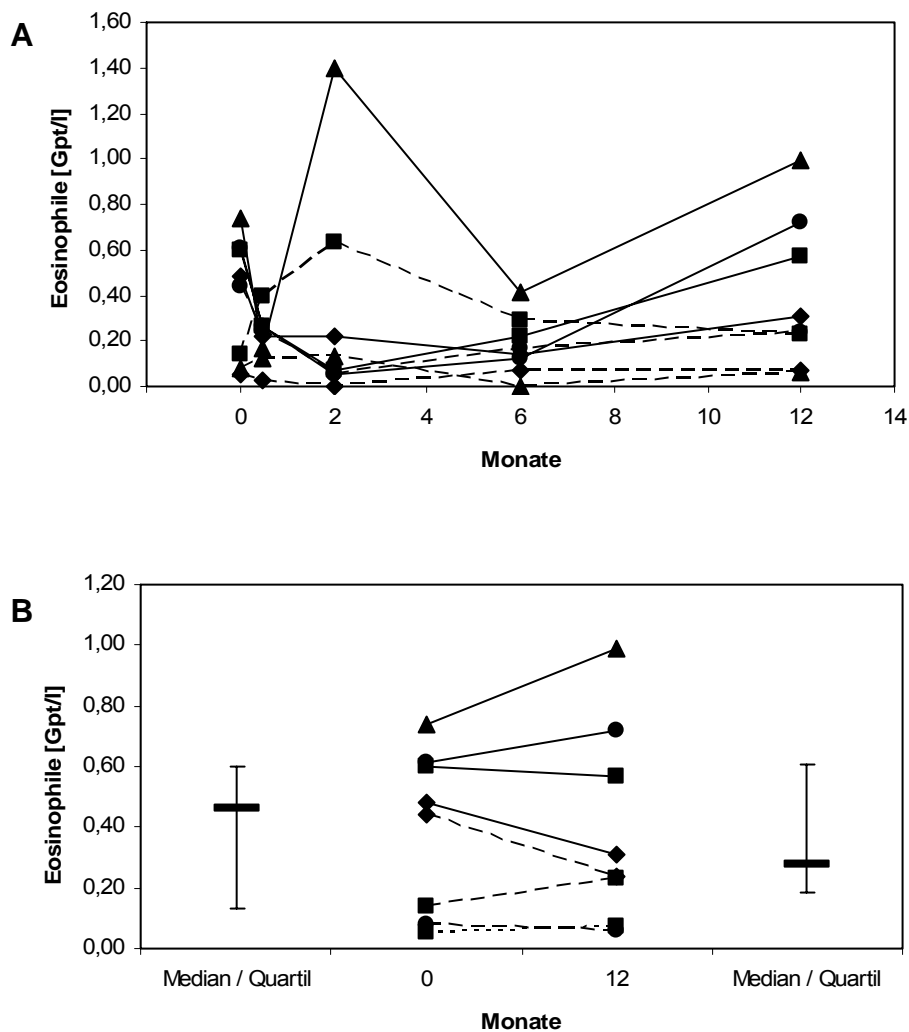


Abbildung 4.8: Veränderung der Eosinophilenzellzahl unter IFN- α -Therapie. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Eosinophilenzellzahl über den Behandlungszeitraum von 12 Monaten (**A**). Abgebildet ist der direkte Vergleich der Einzelwerte vor Therapie und nach 12 Monaten Behandlung. Zusätzlich sind der Median und die 25-75%-Quartile für die Messzeitpunkte eingetragen (**B**). Die Eosinophilenzellzahl wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Die Daten wurden für 8 Asthmatiker erfasst und sind in Gpt/l angegeben.

4.3.2 Phänotyp eosinophiler Granulozyten

Aufgrund der zentralen Rolle des eosinophilen Granulozyten als charakteristische Effektorzelle der chronischen Entzündung beim Asthma bronchiale wurde der Einfluss der IFN- α -Therapie auf dessen Phänotyp untersucht. Dazu wurde die Expression:

- der Aktivierungsmarker CD11b, CD13 und CD69,
- des Interleukin-5-Rezeptors (CD125),
- des GM-CSF-Rezeptors (CD116),

- des Apoptoseinduktors CD95 und seines Liganden CD95L sowie
- des Adhäsionsrezeptors CD44

unter Interferon- α -Therapie zu den Messzeitpunkten vor Therapie, nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten durchflusszytometrisch bestimmt. Von zwei Patienten konnten die Messergebnisse aus labortechnischen Gründen nicht verwertet werden. Für die statistische Auswertung standen die Messergebnisse von sechs Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale über den Studienzeitraum von 12 Monaten zur Verfügung.

CD11b gilt als Marker für die Aktivität des eosinophilen Granulozyten. Verglichen mit anderen Oberflächenmarkern wies dieser die höchste Expressionsdichte auf. Für vier Patienten ließ sich eine annähernd unveränderte Expression über den gesamten Studienzeitraum beobachten. Bei zwei Patienten (AE, SE) war nur zum Messzeitpunkt 2 Monate eine abweichende Expressionsdichte zu verzeichnen. Ab dem 6. Therapiemonat zeigten alle Patienten ($n = 6$) nur geringe Variationen des relativen Anteils der CD11b-exprimierenden eosinophilen Granulozyten. Die Expression befand sich innerhalb eines Intervalls zwischen 91,0 % [79,8 - 98,5] und 97,1 % [81,2 - 98,9]. Bei dem direkten Vergleich der Mediane vor Therapie und nach 12 Behandlungsmonaten mit IFN- α fand sich keine signifikante Veränderung (Tab. 4.3).

CD13 wird bei Aktivierung auf dem eosinophilen Granulozyten exprimiert und ist an der Transmigration beteiligt (Braun et al. 2003). Bei dem relativen Anteil der CD13-exprimierenden eosinophilen Granulozyten waren zwischen Therapiebeginn und dem 2. Behandlungsmonat größere Expressionsänderung bei allen Patienten ($n = 6$) zu verzeichnen. Nach dem 2. Therapiemonat blieb die CD13-Expression konstant. Zwischen den einzelnen Asthmatikern bestanden jedoch größere Expressionsunterschiede. Bei drei Patienten (KM, KE, MD) kam es zu einem Anstieg der CD13-Expression auf eosinophilen Granulozyten nach 12 Monaten IFN- α -Therapie. Zwei Patienten (AE, SE) zeigten eine Reduktion der CD13-Expression und für einen Patienten (FH) war keine Veränderung der Expressionsdichte unter Therapie nachweisbar. Der Median verringerte sich zwischen den Messzeitpunkten vor Therapie und 12 Monaten IFN- α -Behandlung nicht signifikant von 82,7 % [15,4 - 99,9] auf 78,9 % [32,8 - 99,3] (Tab. 4.3).

CD69 zählt zu den sehr früh exprimierten Aktivierungsmarkern des eosinophilen Granulozyten. Darüber hinaus wird ihm die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion in eosinophilen Granulozyten zugeschrieben. Der relative Anteil der CD69-exprimierenden Eosinophilen erhöhte sich für fünf Patienten unter IFN- α -Therapie geringfügig. Ein Patient (SE) zeigte nach 12 Monaten Therapie eine geringere Expressionsdichte. Der Vergleich der Mediane vor und nach 12 Monaten IFN- α -Behandlung lässt einen nicht signifikanten Anstieg des relativen Anteils CD69-exprimierender eosinophiler Granulozyten von 0,6 % [0,4 - 11,5] auf 5,2 % [1,2 - 9,7] erkennen (Tab. 4.3).

Tabelle 4.3: Relativer Anteil der Aktivierungsmarker CD11b, CD13 und CD69 auf eosinophilen Granulozyten bei 6 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale unter IFN- α -Therapie. Die Ermittlung der Messwerte erfolgte durchflusszytometrisch nach Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD11b, CD13 und CD69. Die Daten sind als Median zuzüglich Minimum und Maximum angegeben. * Auf Signifikanz wurde die Veränderung der Mediane vor Therapie und nach 12 Monaten IFN- α -Therapie geprüft.

		Vor Therapie	Unter IFN- α -Therapie		p*
			6 Monate	12 Monate	
CD11b⁺/Eos (Prozent)	Median	96,3	91,0	97,7	p > 0,05
	Min	95,6	79,8	81,2	
	Max	99,3	98,5	98,9	
CD13⁺/Eos (Prozent)	Median	82,7	86,7	78,9	p > 0,05
	Min	15,4	32,8	32,8	
	Max	99,9	88,9	99,3	
CD69⁺/Eos (Prozent)	Median	0,6	8,7	5,2	p > 0,05
	Min	0,4	5,4	1,2	
	Max	11,5	30,2	9,7	
	n	6	6	6	

CD125 ist als IL-5-Rezeptor für die Vermittlung der Differenzierung, Migration und Aktivierung des eosinophilen Granulozyten verantwortlich. Somit ist seine Expression Ausdruck einer proentzündlichen Immunitätslage. Es zeigten sich zunächst große individuelle Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Patienten (n = 6) sowie ausgeprägte Expressionsschwankungen unter Therapie. Dabei konnten diese Unterschiede nicht durch bestimmte Merkmalsausprägungen, wie z. B. das Alter der Patienten, erklärt werden (Abb. 4.9A). Der aus den Einzelmessungen ermittelte Median der CD125-Expression auf eosinophilen Granulozyten verringerte sich nicht

signifikant von 74,2 % [15,5 - 95,0] vor, auf 52,6 % [46,9 - 80,3] nach 12-monatiger Interferon- α -Therapie (Abb. 4.9B).

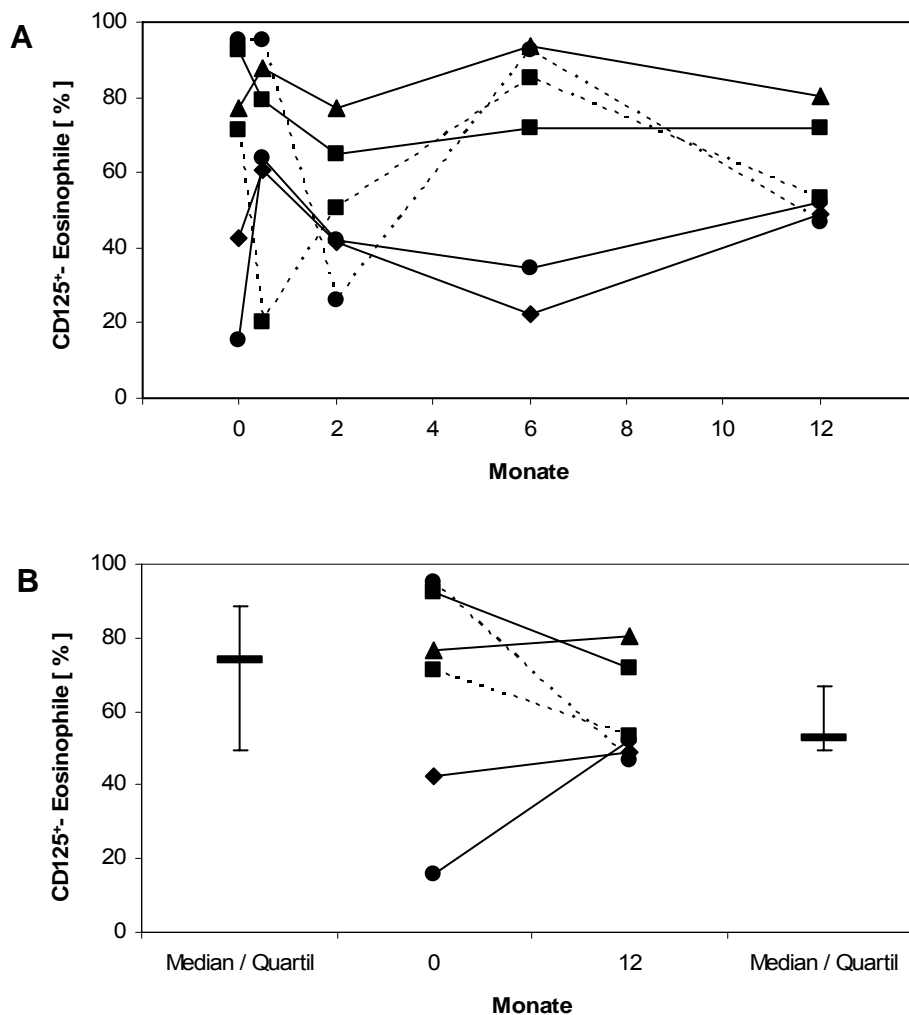


Abbildung 4.9: Relativer Anteil der CD125-exprimierenden eosinophilen Granulozyten unter Interferon- α -Therapie. Die Abbildung zeigt die CD125-Expression auf Eosinophilen zu den Messzeitpunkten vor Therapie, nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten Interferon- α -Therapie (**A**). Dargestellt ist der direkte Vergleich der Einzelwerte vor Therapie und nach 12 Monaten. Zusätzlich sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für die beiden Messzeitpunkte eingetragen (**B**). Die Daten wurden durchflusszytometrisch ermittelt und sind für 6 Asthmatiker in Prozent angegeben.

CD116 fungiert als GM-CSF-Rezeptor auf eosinophilen Granulozyten. Der relative Anteil der CD116-exprimierenden Eosinophilen variierte sowohl zwischen den Patienten als auch beim einzelnen Patienten (n = 6) über den gesamten Studienzeitraum von 12 Monaten. Für vier Patienten war unter Therapie eine Expressionsabnahme und für zwei Patienten eine Expressionszunahme zu beobachten (Abb. 4.10A). Für den Expressionsrückgang des GM-CSF-Rezeptor im Median von 36,7 % [2,7 - 99,2] vor Therapie auf 12,4 % [3,6 - 55,8] nach 12

Monaten IFN- α -Behandlung konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden (Abb. 4.10B).

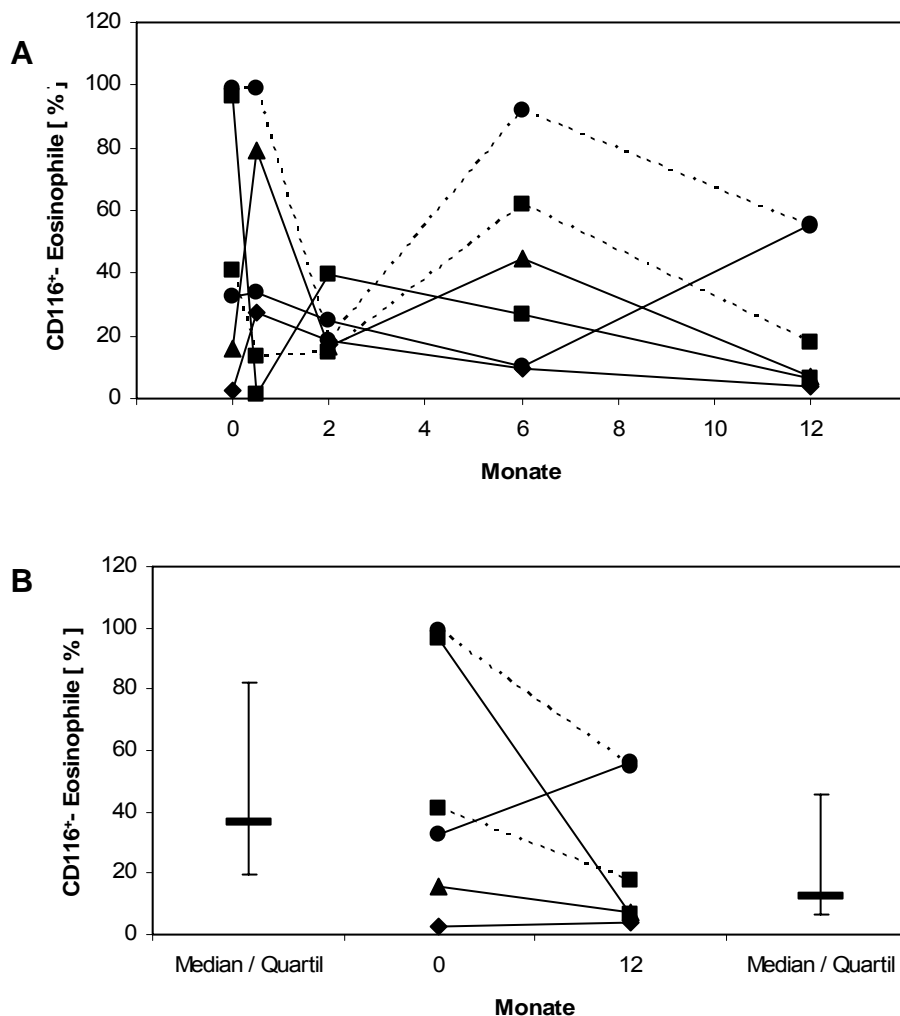


Abbildung 4.10: Relativer Anteil der CD116-exprimierenden eosinophilen Granulozyten unter Therapie mit Interferon- α . Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der CD116-Expression zu den Messzeitpunkten vor Therapie, nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten Interferon- α -Therapie (A). Die Abbildung zeigt den direkten Vergleich der Einzelwerte vor Therapie und nach 12 Monaten. Darüber hinaus sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für die beiden Messzeitpunkte eingetragen (B). Die Messwerte wurden durchflusszytometrisch ermittelt und sind für 6 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale in Prozent angegeben.

CD95 (Apo-1, Fas) ist ein Typ-I-integrales Transmembranprotein, das zur Superfamilie der Tumor Necrosis Factor (TNF)/Nerve Growth Factor (NGF)-Rezeptoren gehört (Trauth et al. 1989). Der CD95-Rezeptor wird von aktivierten T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten exprimiert (Hebestreit et al. 1996). Der relative Anteil der CD95-exprimierenden eosinophilen Granulozyten ergab für die Asthmatiker (n = 6) im Median eine geringe, statistisch nicht signifikante Reduktion von 95,2 % [66,0 - 98,9] vor Therapie auf 83,8 % [69,7 - 96,7] nach 12 Monaten

Interferon- α -Behandlung (Tab. 4.4). Die individuellen Verläufe der Patienten zeigten über den Studienzeitraum nur geringe Veränderungen der CD95-Expression.

CD95L zählt zu den Typ-II-integralen Membranproteinen, das sowohl auf aktivierten T-Lymphozyten als auch eosinophilen Granulozyten exprimiert wird (Suda et al. 1993). Durch Interaktion mit dem CD95-Rezeptor führt der CD95-Ligand zur Apoptose (Nagata und Golstein 1995). Für CD95L auf eosinophilen Granulozyten wurde bei den Patienten (n = 6) eine geringe Expressionsdichte gemessen. Im Median verringerte sich der relative Anteil der CD95L-exprimierenden Eosinophilen nicht signifikant von 1,5 % [0,3 - 12,4] vor Therapie auf 1,2 % [0,3 - 23,8] nach 12 Monaten Behandlung (Tab. 4.4).

Tabelle 4.4: *CD95- und CD95L-Expression auf eosinophilen Granulozyten bei 6 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale unter IFN- α -Therapie. Die Ermittlung der Messwerte erfolgte durchflusszytometrisch nach Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD95 und CD95L. Die Daten sind als Median zuzüglich Minimum und Maximum angegeben. * Auf Signifikanz wurde die Veränderung der Mediane vor Therapie und nach 12 Monaten IFN- α -Therapie geprüft.*

		Vor Therapie	Unter IFN- α -Therapie		p*
			6 Monate	12 Monate	
CD95⁺/Eos (Prozent)	Median	95,2	89,6	83,8	p > 0,05
	Min	66,0	76,5	69,7	
	Max	98,9	98,5	96,7	
CD95L⁺/Eos (Prozent)	Median	1,5	1,5	1,2	p > 0,05
	Min	0,3	0,9	0,3	
	Max	12,4	11,1	23,8	
	n	6	6	6	

CD44 gehört zu den Zelladhäsionsmolekülen. Adhäsionsmoleküle vermitteln Zell-Zell-Interaktionen oder die Bindung einer Zelle an zelluläre Matrixproteine (Springer 1990). CD44 wird eine wichtige Rolle bei der Infiltration des Eosinophilen in das entzündliche Bronchialgewebe zugeschrieben (Kato et al. 1999). Ein Patient (SE) zeigte eine geringe und ein Patient (KM) eine starke Zunahme des relativen Anteils CD44-exprimierender Eosinophiler. Bei vier Patienten war eine Abnahme der Expressionsdichte zu verzeichnen. Im Median reduzierte sich die CD44-Expression

nicht signifikant von 29,6 % [3,4 – 60,4] vor Therapie auf 15,4 % [7,4 – 89,1] nach 12 Monaten IFN- α -Therapie (Abb. 4.11).

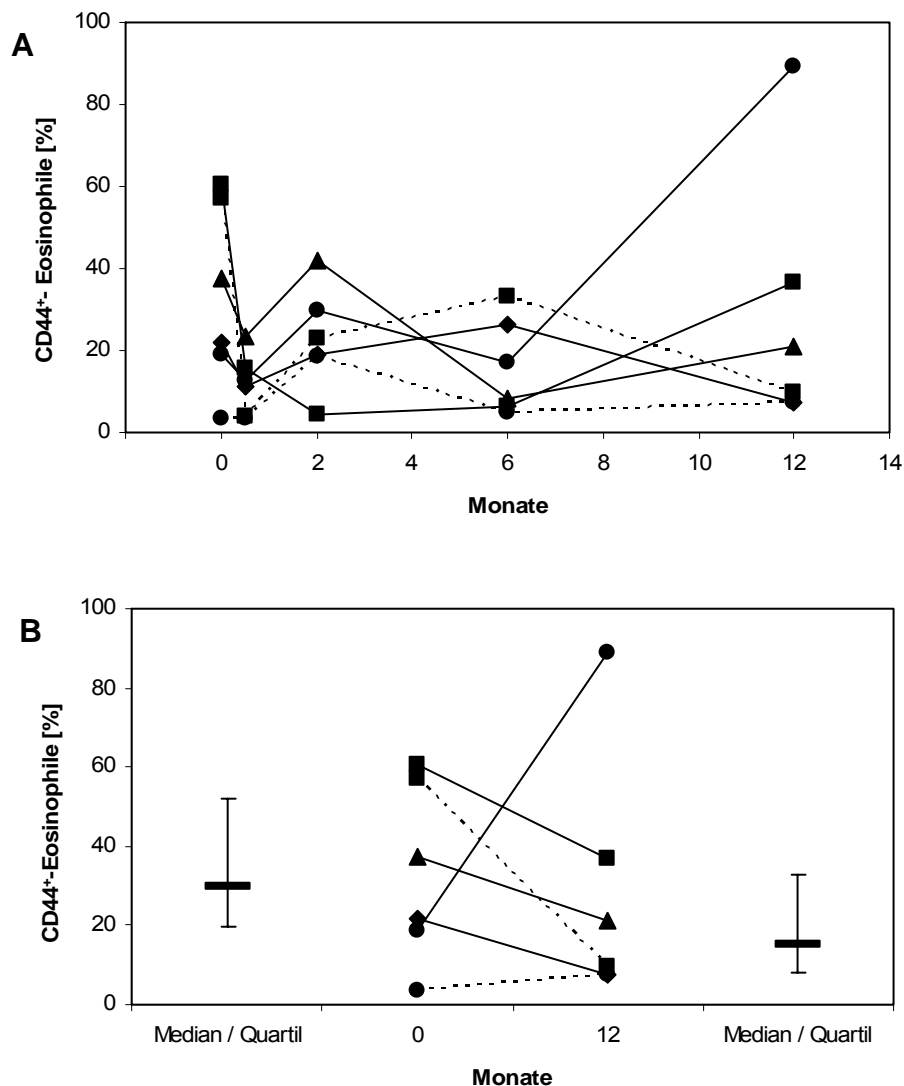


Abbildung 4.11: Relativer Anteil der CD44-exprimierenden eosinophilen Granulozyten unter Therapie mit Interferon- α . Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der CD44-Expression über den Therapiezeitraum von 12 Monaten (**A**). Die Abbildung zeigt den direkten Vergleich der Einzelwerte vor Therapie und nach 12 Monaten. Darüber hinaus sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für die beiden Messzeitpunkte eingetragen (**B**). Die Messwerte wurden durchflusszytometrisch ermittelt und sind für 6 Asthmatiker in Prozent angegeben.

4.3.3 Lymphozyten-Subpopulationen

Auf Grundlage der Kenntnis über die Immunpathogenese der chronisch-entzündlichen Erkrankung beim schwergradig persistierenden Asthma bronchiale erfolgte die Analyse beteiligter Lymphozyten-Subpopulationen. Diese wurde mittels durchflusszytometrischer Messung der fluoreszenzmarkierten Oberflächenantigene für B-Zellen, NK-Zellen und T-Zellen durchgeführt. CD4⁺ wird von T-Helfer-Zellen, CD8⁺ von T-Suppressor-Zellen exprimiert. In der Auswertung wurde der relative Anteil

CD4⁺- und CD8⁺-Zellen an T-Lymphozyten bestimmt und die ermittelten Werte mit den geltenden Normwerten des Routinelabors der Friedrich-Schiller-Universität Jena verglichen.

B-Zellen sind für die IgE-Synthese verantwortlich. Der relative Anteil der B-Zellen nahm bei sieben Patienten unter IFN- α -Therapie bis zum 12. Behandlungsmonat ab. Bei einem Patienten (SE) zeigte sich nach 12 Monaten IFN- α -Therapie ein minimaler Anstieg des relativen Anteils der B-Zellen von 6,9 % auf 8,2 %. Im Median ist eine Abnahme der B-Zellpopulation von 10,4 % [6,4 - 22,5] auf 8,0 % [4,2 - 13,9] mit statistischer Signifikanz ($p < 0,05$) zu beobachten (Abb. 4.12).

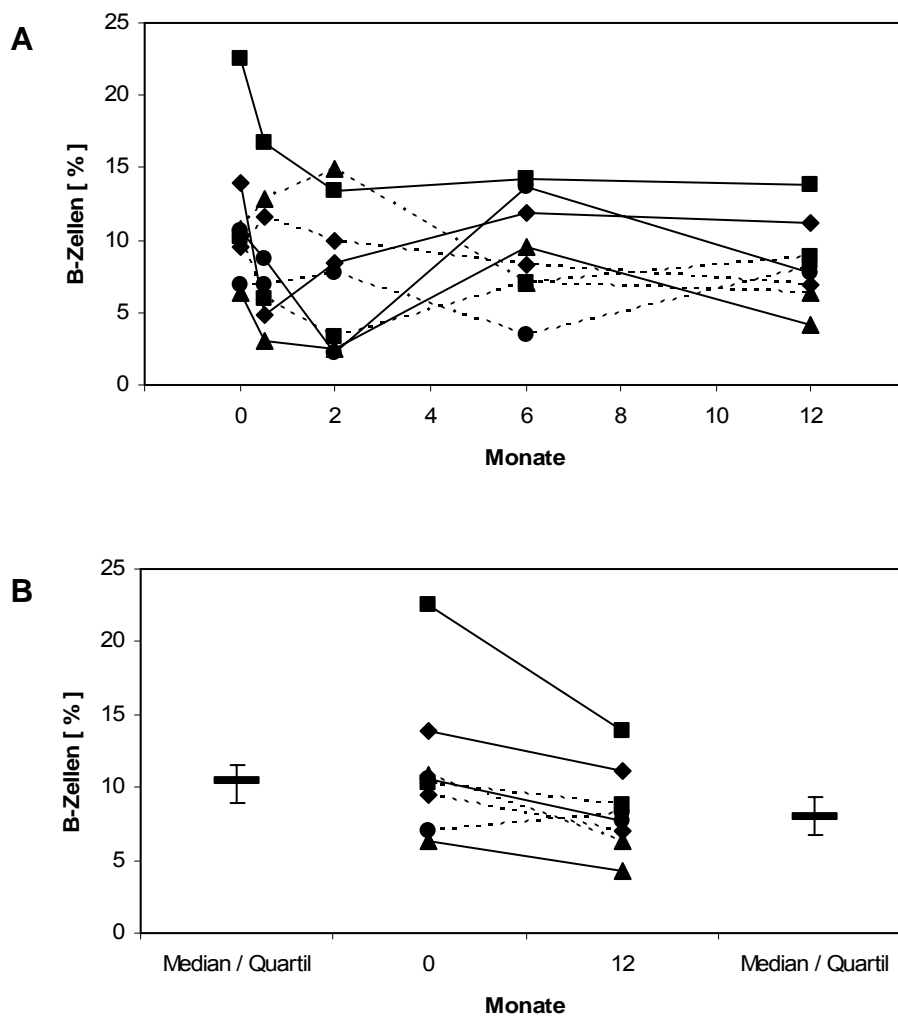


Abbildung 4.12: Veränderung des relativen Anteils der B-Zellen unter IFN- α -Therapie. Dargestellt ist der relative Anteil der B-Zellen über den Therapiezeitraum von 12 Monaten (A). Abgebildet ist der direkte Vergleich der Einzelwerte vor Therapie und nach 12 Monaten Behandlung. Zusätzlich sind der Median und die 25-75%-Quartile angegeben (B). Die Daten wurden durchflusszytometrisch ermittelt und sind für 8 Asthmatiker in Prozent angegeben.

Das von den B-Zellen produzierte IgE fördert die Mastzelldegranulation. Dabei werden Mediatoren der asthmatischen Frühreaktion, wie Tryptase und Histamin freigesetzt. In Verbindung mit der Bewertung der Veränderung der B-Zellpopulation unter IFN- α -Therapie erschien nach Studienabschluss die Betrachtung der IgE-Konzentration als ein wichtiger Aspekt. Die Veränderung der IgE-Konzentration unter IFN- α -Therapie wurde für die Patienten der Studie nicht generell ermittelt und aufgezeichnet. Für einzelne Patienten lagen die Messwerte zu verschiedenen Zeitpunkten im Differentialblutbild aus dem Routinelabor vor und sind in Tabelle 4.5 zusammengestellt. Die IgE-Konzentration zeigte bei fünf der sechs Patienten zum Kontrolltermin 12 Monate eine geringere Konzentration gegenüber dem früher erfassten Messwert (vor Therapie bzw. 2 oder 6 Monate unter IFN- α -Therapie). Nur bei einem Patienten (SE) war eine Zunahme der IgE-Konzentration zu verzeichnen.

Tabelle 4.5: Veränderung der IgE-Konzentration im Differentialblutbild unter IFN- α -Therapie. Die Daten wurden für 6 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale im Routinelabor bestimmt und sind in internationalen Einheiten/ml (IE/ml) angegeben.

Patient	IgE [IE/ml]			
	Vor Therapie	Unter IFN- α -Therapie		
		2 Monate	6 Monate	12 Monate
AE	-	-	30,2	21,7
FH	-	27,1	-	15,3
KM	-	-	177,6	159,0
SE	348,0	-	-	525,0
SK	-	-	238,0	159,0
ZM	17,5	-	-	< 2

CD4⁺-T-Zellen sind maßgeblich am asthmatischen Entzündungsgeschehen beteiligt. Für den relativen Anteil der CD4⁺-T-Lymphozyten im peripheren Blut ergab sich ein statistisch nicht signifikanter Anstieg von 73,2 % [54,2 - 88,4] vor Therapie auf 77,4 % [54,1 - 89,5] nach 12 Monaten Interferon- α -Behandlung (Abb. 4.13B). Dabei lagen über den gesamten Studienzeitraum von 12 Monaten die Einzelwerte von fünf Patienten über und von drei Patienten an der oberen Grenze des gültigen Referenzbereiches von 28,0 % bis 58,0 %. Der relative Anteil der CD4⁺-T-Lymphozyten bezogen auf alle CD3⁺-T-Zellen zeigte nur geringe Variationen (Abb. 4.13A).

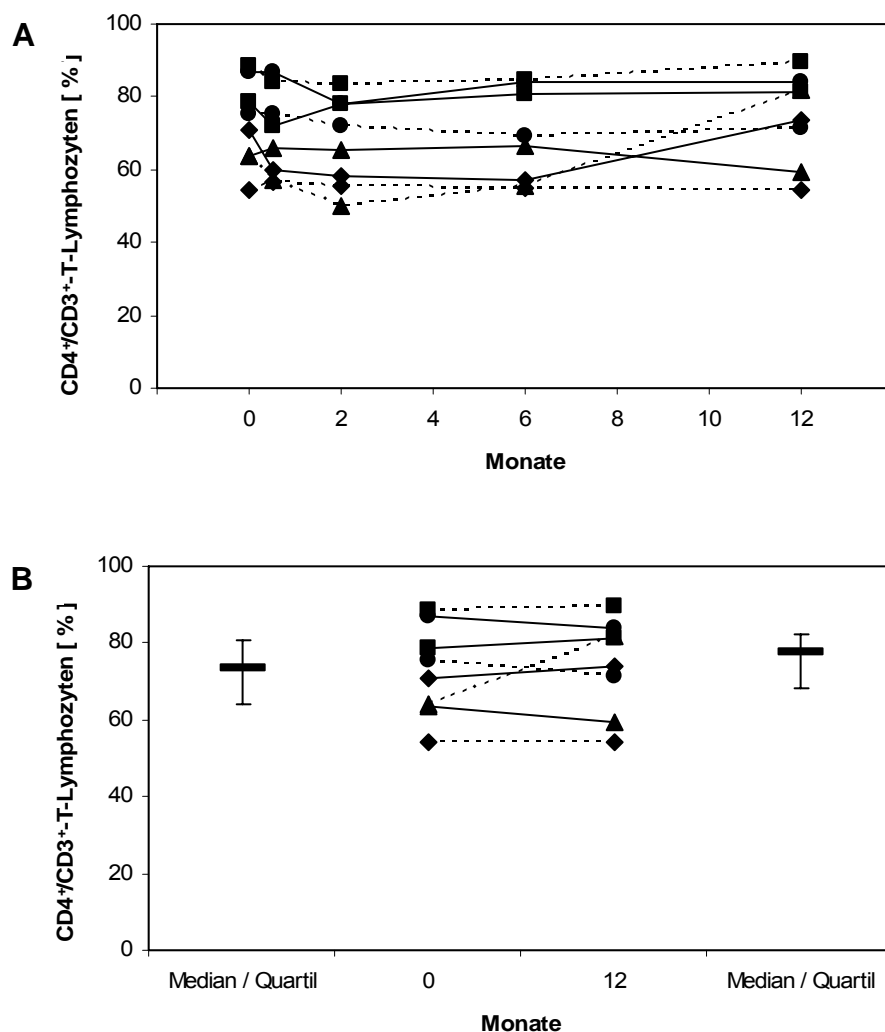


Abbildung 4.13: Veränderung des relativen Anteils der CD4⁺-T-Zellen unter IFN- α -Behandlung. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des relativen Anteils der CD4⁺-T-Zellen über einen Therapiezeitraum von 12 Monaten (**A**). Die Abbildung zeigt den direkten Vergleich des relativen Anteils der CD4⁺-T-Zellen vor Therapie und nach 12 Monaten Behandlung. Zusätzlich sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für diese Messzeitpunkte eingetragen (**B**). Die Messwerte wurden durchflusszytometrisch ermittelt. Die Daten sind für 8 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale in Prozent angegeben.

CD8⁺-T-Zellen sind Supressorzellen. Die Einzelverläufe des relativen Anteils der CD8⁺-T-Zellen zeigten vor und während der IFN- α -Therapie ebenfalls nur geringe Schwankungen (Abb. 4.14A). Zunächst ließ sich im Median ein Anstieg um 8 % von 17,1 % [8,4 - 31,7] vor Therapiebeginn auf 25,0 % [2,6 - 37,5] nach 6 Monaten beobachten. Nach 12 Monaten lag der Median des relativen Anteils der CD8⁺-T-Lymphozyten mit 17,6 % [6,6 - 31,8] fast auf dem Ausgangsniveau von 17,1 % [8,4 - 31,7]. Der Vergleich der Mediane der CD8⁺-Zellzahl vor Therapie mit der nach 12 Monaten zeigt eine geringfügige, nicht signifikante Zunahme von 17,1 % [8,4 - 31,7] auf 17,6 % [6,6 - 31,8] (Abb. 4.14B).

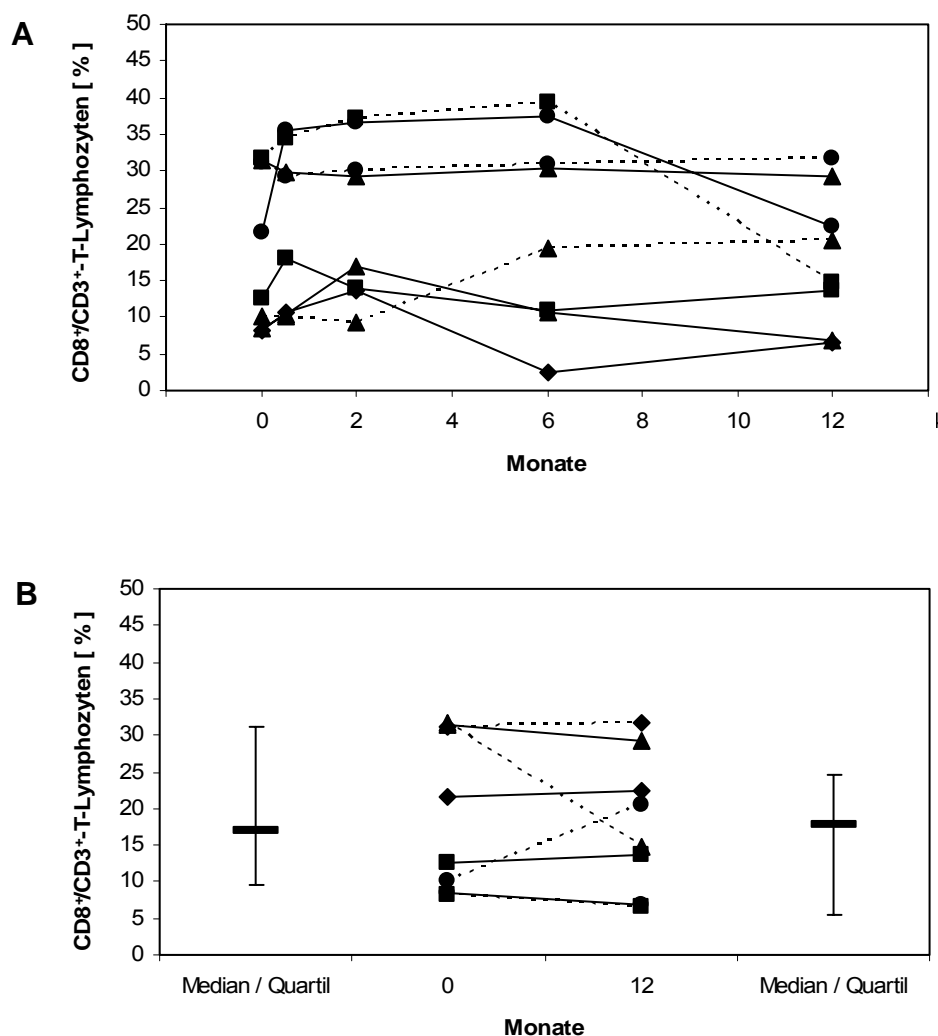


Abbildung 4.14: Veränderung des relativen Anteils der CD8⁺-T-Zellen unter IFN- α -Therapie. Dargestellt ist der zeitlicher Verlauf des relativen CD8⁺-T-Zellanteils über den Therapiezeitraum von 12 Monaten (A). Abgebildet ist der direkte Vergleich der Einzelverläufe vor Therapie und nach 12 Monaten Behandlung. Zusätzlich sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für diese beiden Messzeitpunkte eingetragen (B). Die Messwerte wurden durchflusszytometrisch ermittelt und sind in Prozent für 8 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale angegeben.

Der **CD4⁺/CD8⁺-Quotient** erhöhte sich über den 12-monatigen Behandlungszeitraum für drei von acht untersuchten Patienten und nahm für die übrigen fünf Patienten ab. Der Median des CD4⁺/CD8⁺-Quotienten lag zu Therapiebeginn mit 4,8 [1,7 – 10,9] über dem oberen Normwert von 2,8. Bereits nach 2 Wochen reduzierte sich der Quotient auf 3,1 und befand sich nach 6 Monaten mit 2,9 unmittelbar oberhalb des Referenzbereiches (0,6 bis 2,8). Im weiteren Therapieverlauf kam es zu einem erneuten Anstieg des CD4⁺/CD8⁺-Quotienten auf 4,5 [1,7 - 13,5] (Abb. 4.15).

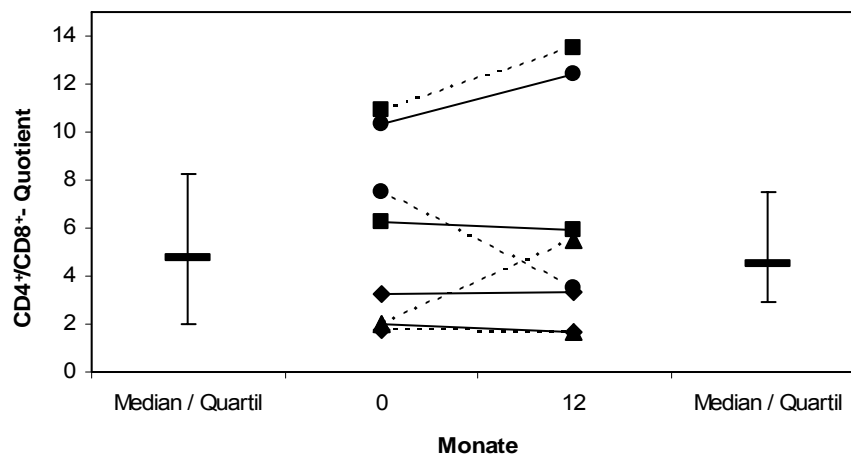


Abbildung 4.15: *Quotient der relativen Anteile von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten unter IFN- α -Therapie.* In der Abbildung sind die Einzelwerte des CD4⁺/CD8⁺-Quotienten von 8 Asthmatikern vor und nach 12 Monaten IFN- α -Therapie gegenübergestellt. Zusätzlich sind der Median und die 25 - 75%-Quartile angegeben.

Natürliche Killer (NK)-Zellen dienen der lymphozytären Abwehr im peripheren Blut. Für den relativen Anteil der NK-Zellen ergab sich für die Patienten (n = 8) ein nicht signifikanter Anstieg von 6,9 % [0,9 - 15,1] vor Therapie auf 10,4 % [4,4 - 17,9] nach 12 Monaten IFN- α -Behandlung. Bei zwei Patienten (FH, KM) war eine Abnahme des relativen Anteils der NK-Zellen auf 73,0 % bzw. 47,0 % des Wertes vor Therapie zu verzeichnen. Für 75 % der untersuchten Asthmatiker ließ sich nach 12-monatiger Behandlung eine Steigerung des relativen Anteils der NK-Zellen um das 1,2- bis 9,5fache nachweisen (Tab. 4.6).

γ/δ -T-Lymphozyten zählen zu den modulierenden Zellen der asthmatischen Entzündung. Außerdem reichern sie sich lokal im Rahmen von bakteriellen und mykobakteriellen Infektionen an und beeinflussen den Verlauf der Erkrankung (Kroegel 2002). Für den relativen Anteil der γ/δ -T-Zellen ließ sich bei den Patienten

eine signifikante Abnahme ($p < 0,05$) von 4,6 % [1,6 – 12,9] vor Therapie auf 1,5 % [1,0 - 2,0] nach 12-monatiger Behandlung beobachten. Unter der Interferon- α -Therapie verringerte sich die Streubreite der γ/δ -T-Zell-Einzelwerte deutlich (1,6 – 12,9 % vor Therapie versus 1 - 2 % nach 12 Monaten). Zum Messzeitpunkt 12 Monate bestand eine auffallende Homogenität des relativen Anteils der γ/δ -T-Zellzahl (Tab. 4.6).

Tabelle 4.6: Veränderung des relativen Anteils der NK-Zellen und der γ/δ -T-Lymphozyten unter IFN- α -Therapie bei 8 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale. Die Ermittlung der relativen Anteile der NK-Zellen sowie der γ/δ -T-Lymphozyten erfolgte durchflusszytometrisch. Die Messwerte sind als Median zuzüglich Minimum und Maximum angegeben. * Auf Signifikanz wurde die Veränderung der Mediane vor Therapie und nach 12 Monaten IFN- α -Therapie geprüft.

		Vor Therapie	Unter IFN- α -Therapie		p*
			6 Monate	12 Monate	
NK-Zellen (Prozent)	Median	6,9	9,9	10,4	p > 0,05
	Min	0,9	1,8	4,4	
	Max	15,1	28,1	17,9	
γ/δ -T-Lymphozyten (Prozent)	Median	4,6	1,3	1,5	p < 0,05
	Min	1,6	0,1	1,0	
	Max	12,9	16,0	2,0	
	n	8	8	8	

4.3.4 Phänotyp von CD4⁺-T-Lymphozyten

Analog zu den anderen analysierten Zellantigenen erfolgte die Messung der Expression der CD4⁺-T-Lymphozytenoberflächenmarker durchflusszytometrisch nach Markierung der aufgereinigten Lymphozyten des peripheren Blutes mit fluoreszenztragenden Antikörpern. Für den Nachweis der Veränderung früher Aktivierungsmarker der asthmatischen Inflammation unter Interferon- α -Therapie wurde die Expression von CD25 und CD69 auf CD4⁺-T-Lymphozyten gemessen. Die durchflusszytometrische Analyse von VLA-1- und HLA-DR-exprimierenden CD4⁺-T-Lymphozyten zeigt die Entwicklung mittlerer und später Aktivierungsmarker unter Therapie.

Bei der Bestimmung der Expression von CD4⁺-T-Zellphänotypen konnten aus labortechnischen Gründen Daten über die Expression der Oberflächenantigene CD45RO, CD69, CD95, CD95L und CD103 von zwei Patienten und Daten der Expression der Oberflächenantigene VLA-1 und HLA-DR von einem Patienten nicht verwertet werden.

CD25 auf CD4⁺-T-Lymphozyten, auch als Interleukin-2-Rezeptor bezeichnet, zählt zu den frühen inflammatorischen Aktivierungsmarkern. Die Expression von CD25 auf CD4⁺-T-Lymphozyten unterlag bis zum 2. Behandlungsmonat bei den Patienten (n = 8) starken Schwankungen. Ab dem 2. Therapiemonat kam es bei 50 % der Patienten zu einer kontinuierlichen Abnahme der CD25-exprimierenden Zellen um 5,1 % bis 22,6 %. Bei den verbleibenden Asthmatikern stieg der relative Anteil der CD25⁺/CD4⁺-Zellzahl um 1,5 % bis 16,0 % gegenüber dem Zweimonatswert. Nach 6 Monaten Therapie nahm die Zahl der IL-2-rezeptortragenden CD4⁺-T-Zellen bei sechs Patienten ab und bei zwei Patienten zu (Abb. 4.16A). Bei dem direkten Vergleich der Mediane der CD25-exprimierenden CD4⁺-T-Lymphozyten vor Therapiebeginn und nach 12-monatiger Behandlung lässt sich eine geringfügige, jedoch nicht signifikante Erhöhung ($p > 0,05$) der CD25⁺/CD4⁺-T-Zellzahl von 18,5 % [7,6 - 74,5] auf 26,6 % [10,7 - 36,6] unter Interferon- α -Therapie nachweisen (Abb. 4.16B).

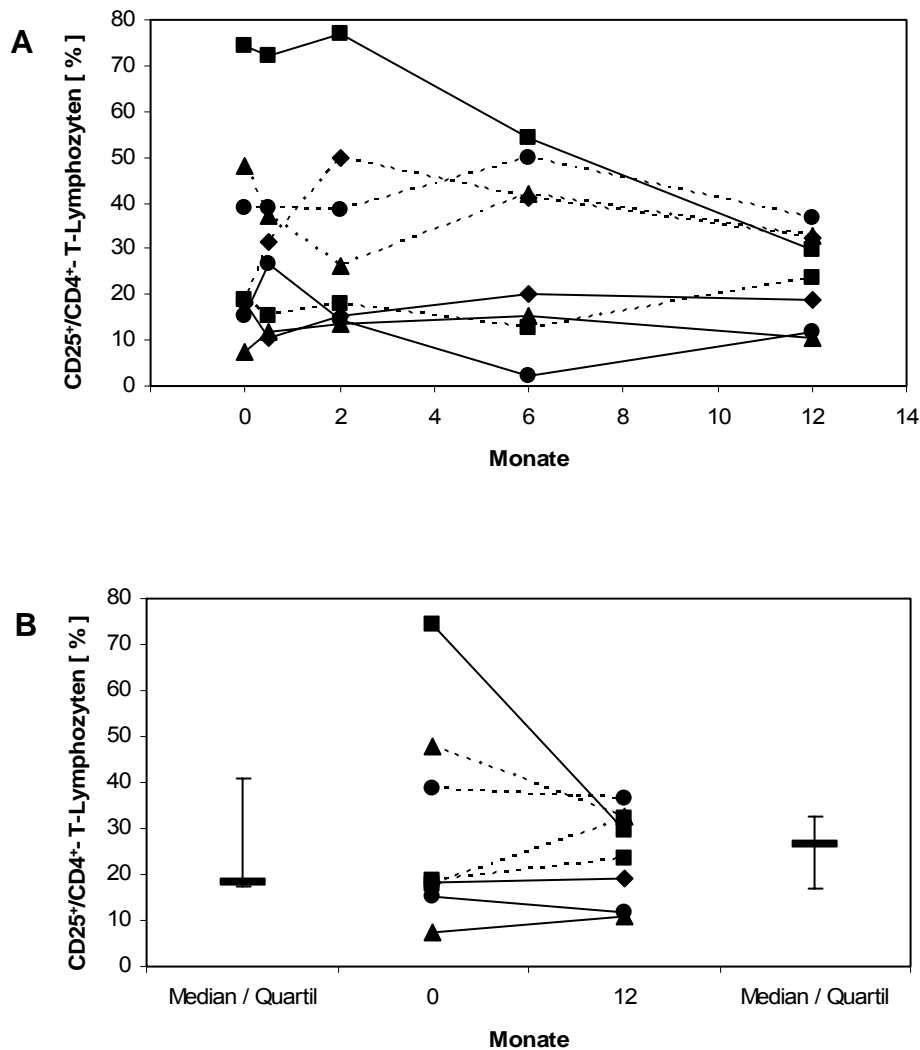


Abbildung 4.16: Veränderung des relativen Anteils der CD25⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten unter Interferon- α -Therapie. Dargestellt ist die zeitliche Veränderung der Expression von CD25 auf CD4⁺-T-Lymphozyten zu den Messzeitpunkten vor Therapie, nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten (**A**). Die Abbildung zeigt den direkten Vergleich des relativen Anteils der CD25⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten vor Therapie und nach 12 Monaten. Zusätzlich sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für die beiden Messzeitpunkte ausgewiesen (**B**). Die Messwerte wurden für 8 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale durchflusszytometrisch ermittelt und sind in Prozent angegeben.

Bei dem Oberflächenmarker **CD69** handelt es sich um einen sehr frühen inflammatorischen Aktivierungsmarker. Der relative Anteil von CD69⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten war im Vergleich mit den anderen analysierten Oberflächenantigenen auf CD4⁺-T-Lymphozyten am geringsten ausgeprägt. Bei den Patienten (n = 6), für die zu allen Kontrollterminen die CD69-Expression bestimmt werden konnte, reduzierte sich diese im Median signifikant (p < 0,05) von 0,8 % [0,2 - 13,5] vor Therapie auf 0,2 % [0,0 - 0,8] nach 12 Behandlungsmonaten (Abb. 4.17B). Auch der bei einem der Asthmatiker (AE) in Relation zu den übrigen

Patienten initial gemessene hohe Anteil CD69-exprimierender Zellen von 13,5 % nahm im Verlauf der Therapie ab. Zum Messzeitpunkt 12 Monate lag dieser mit 0,4 % auf einem Niveau mit den anderen Patienten (Abb. 4.17A).

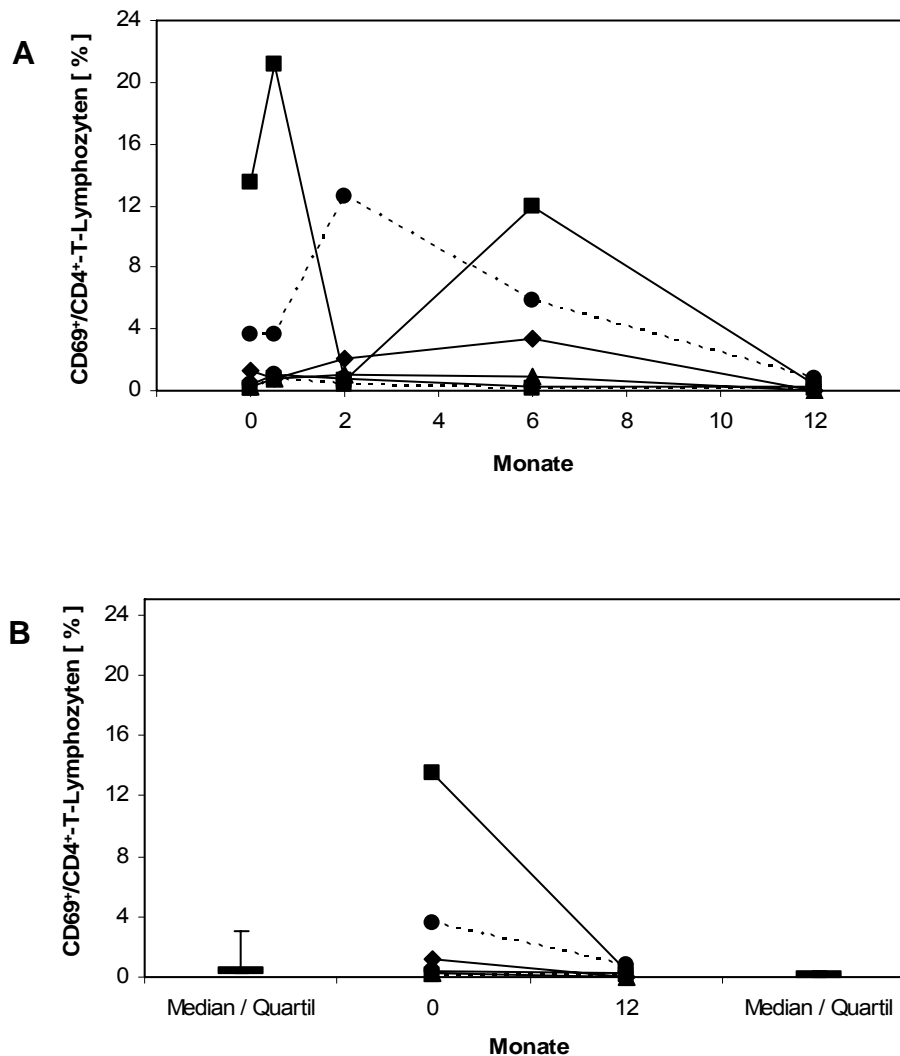


Abbildung 4.17: Veränderung des relativen Anteils der CD69⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten unter IFN- α -Therapie bei Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale. Dargestellt ist der zeitlicher Verlauf der CD69-Expression auf CD4⁺-T-Lymphozyten zu den Messzeitpunkten vor Therapie sowie nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten IFN- α -Behandlung (A). Die Abbildung zeigt den direkten Vergleich des relativen Anteils der CD69⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten vor Therapie und nach 12-monatiger Behandlung. Zusätzlich sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für diese Messzeitpunkte aufgetragen (B). Die Messwerte wurden für 6 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale durchflusszytometrisch ermittelt und sind in Prozent angegeben.

HLA-DR wird im Rahmen chronischer Entzündungsvorgänge exprimiert (Kroegel et al. 1995). Bei der HLA-DR-Expression auf CD4⁺-T-Lymphozyten waren bei den Patienten (n = 7) größere Variationen über den Studienzeitraum erkennbar. Bei der Gegenüberstellung der Mediane vor Therapie und nach 12 Monaten konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen verzeichnet werden. Der Median stieg von 0,6 % [0,3 - 11,5] vor Therapie auf 1,1 % [0,4 - 2,5] nach 12-monatiger Behandlung (Abb.

4.18B). Für zwei Patienten (AE, SE) wurden vor Therapie und nach 2 Monaten Therapie erhöhte relative Anteile HLA-DR-exprimierender CD4⁺-T-Lymphozyten gemessen. Nach 12 Monaten konnte für beide Asthmatiker eine Expressionsdichte auf dem Niveau der übrigen Patienten verzeichnet werden (Abb. 4.18A).

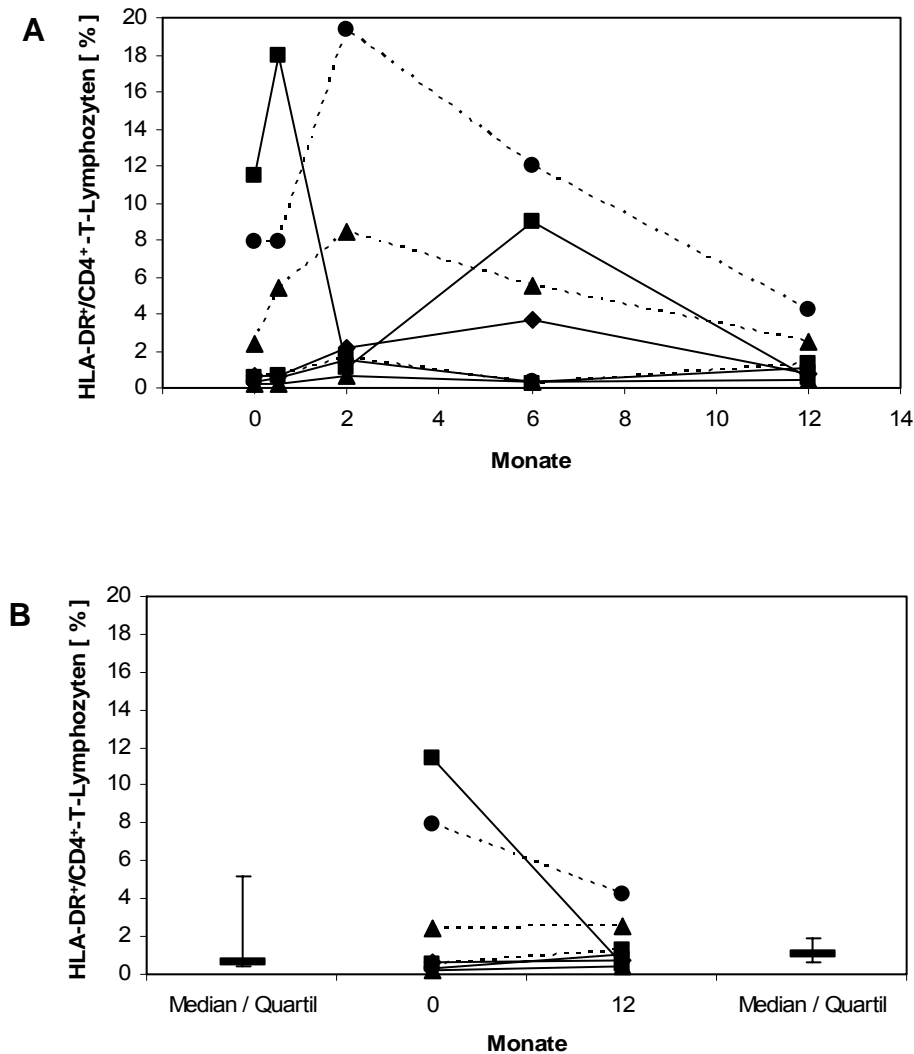


Abbildung 4.18: Veränderung des relativen Anteils der HLA-DR⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten unter IFN- α -Therapie bei Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale. Die Darstellung zeigt die HLA-DR-Expression auf CD4⁺-T-Zellen zu den Messzeitpunkten vor Therapie, nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten (A). Abgebildet ist der direkte Vergleich des relativen Anteils der HLA-DR⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten vor Therapie und nach 12-monatiger Behandlung. Weiterhin sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für die beiden Messzeitpunkte eingetragen (B). Die Messwerte wurden für 7 Asthmatiker durchflusszytometrisch ermittelt und sind in Prozent angegeben.

VLA-1 ist ein Kollagenrezeptor, der zu den sehr späten Aktivierungsmarkern der chronischen Entzündung zählt. Fünf Patienten zeigten während des gesamten Studienzeitraumes keine oder nur minimale Veränderungen der VLA-1-Expression auf CD4⁺-T-Lymphozyten. Bei zwei Patienten waren bei allen untersuchten

Oberflächenmarkern auf $CD4^+$ -T-Lymphozyten stets höhere Ausgangs- und Verlaufswerte zu verzeichnen. Diese beiden Asthmatiker (AE, SE) ließen auch bei der VLA-1-Expression unter Interferon- α einen abweichenden Verlauf erkennen. Zum Messzeitpunkt nach 12 Monaten lag der relative Anteil der VLA-1-exprimierenden Zellen beider Asthmatiker auf dem Niveau der übrigen fünf Patienten (Abb. 4.19A). Der Vergleich der Mediane ergab eine nicht signifikante Zunahme der Zahl VLA-1-exprimierender T-Lymphozyten von 0,9 % [0,1 - 15,6] vor Therapie auf 1,3 % [0,4 - 1,6] nach 12 Monaten (Abb. 4.19B).

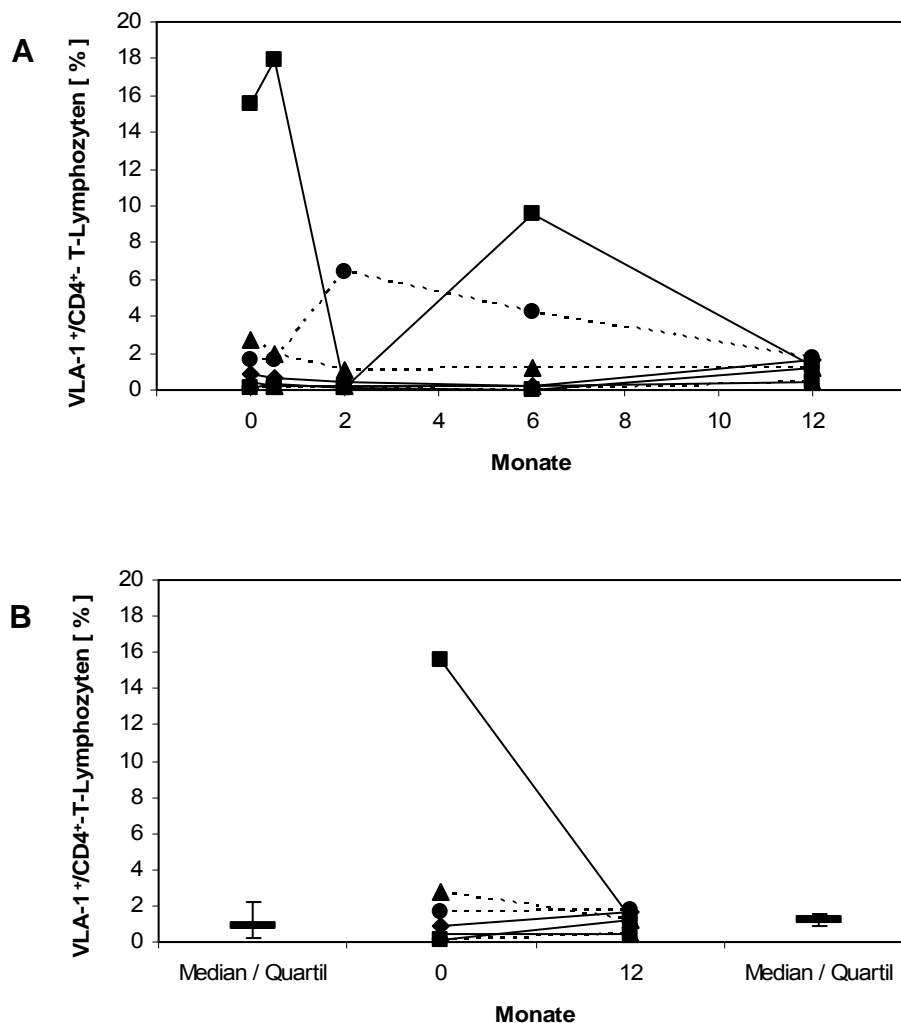


Abbildung 4.19: Veränderung des relativen Anteils der VLA-1⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten unter IFN- α -Therapie. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der VLA-1-Expression auf CD4⁺-T-Zellen (A). Die Abbildung zeigt den direkten Vergleich des relativen Anteils der VLA-1⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten vor Therapie und nach 12-monatiger Behandlung. Weiterhin sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für die beiden Messzeitpunkte eingetragen (B). Die Messwerte wurden für 7 Asthmatiker durchflusszytometrisch ermittelt und sind in Prozent angegeben.

CD45RO ist ein Marker für Memory-T-Zellen. Dieses Antigen zeigte die höchste Expressionsdichte innerhalb der Gruppe untersuchter Oberflächenantigene auf

CD4⁺-T-Zellen. Im Verlauf der Interferon- α -Behandlung blieb die Zahl dieser Zellen bei den Asthmatikern (n = 6) nahezu konstant. Anhand der Abbildung 4.20A wird deutlich, dass die Einzelverläufe der CD45RO-Expression der Patienten dicht beieinander liegen. Die statistische Auswertung der Mediane ergab eine nicht signifikante Abnahme der CD45RO-Expression auf CD4⁺-T-Lymphozyten von 63,7 % [41,9 - 82,5] vor, auf 61,0 % [43,7 - 72,4] nach 12 Monaten IFN- α -Therapie (Abb. 4.20B).

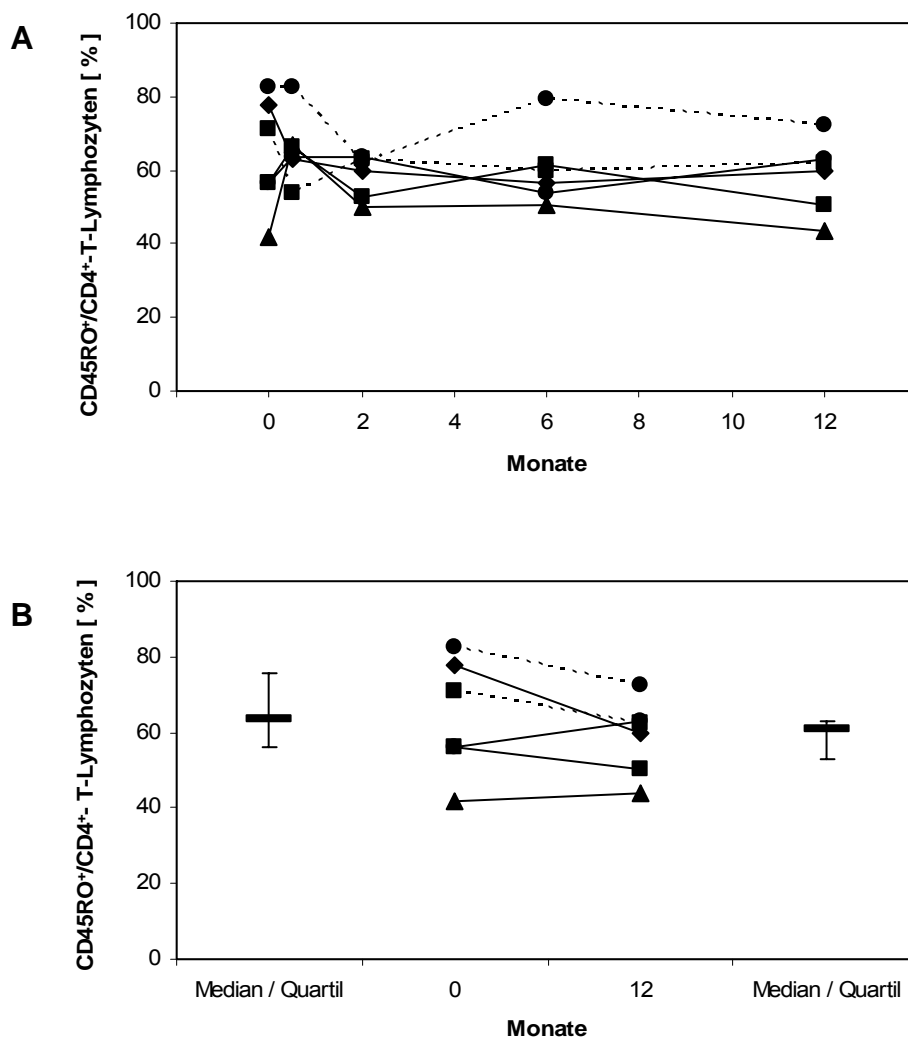


Abbildung 4.20: Veränderung des relativen Anteils der CD45RO⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten unter Interferon- α -Therapie. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Veränderung des relativen Anteils der CD45RO⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten zu den Messzeitpunkten vor und 2 Wochen, 2 Monate, 6 Monate sowie 12 Monate nach Therapie (**A**). Die Abbildung zeigt den direkten Vergleich des relativen Anteils der CD45RO⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten vor Therapie und nach 12-monatiger Behandlung. Weiterhin sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für die beiden Messzeitpunkte eingetragen (**B**). Die Messwerte wurden für 6 Asthmatiker durchflusszytometrisch ermittelt und sind in Prozent angegeben.

CD95 ist der bisher am besten untersuchte Apoptoserezeptor. Engagement des CD95R durch den Liganden führt zum Zelltod. So ist der CD95-assoziierte Zelltod

beispielsweise bei der Elimination „unerwünschter“ Lymphozytenklone für die Feinregulation bzw. Funktion des Immunsystems von Bedeutung (Kramer 1996). Die CD95-Expression auf CD4⁺-T-Lymphozyten ergab für die Patienten (n = 6) eine minimale, statistisch nicht signifikante Reduktion von 57,8 % [46,4 - 91,7] vor Therapie auf 57,3 % [47,7 - 86,2] nach 12 Monaten IFN- α -Behandlung (Abb. 4.21A). Die Einzelverläufe der Patienten unterlagen über den Therapiezeitraum von 12 Monaten nur geringen Variationen. Für einen Patienten (SE) wurde vor Therapie sowie unter Behandlung mit 91,7 % bzw. 86,2 % eine erhöhte Expressionsintensität gemessen.

CD95L auf CD4⁺-T-Lymphozyten führt ebenso wie auf eosinophilen Granulozyten und NK-Zellen durch Interaktion mit dem CD95-Rezeptor zur Apoptoseinduktion. Die Expressionsdichte von CD95L auf CD4⁺-T-Lymphozyten verringerte sich bei den untersuchten Patienten (n = 6) nicht signifikant von 2,6 % [0,3 - 14,1] vor Therapie auf 0,5 % [0,3 - 18,9] nach 12 Monaten Interferon- α -Behandlung (Abb. 4.21B). Für zwei Patienten (AE, SE) war eine Expressionsanstieg von 0,3 % auf 4,1 % (AE) bzw. von 14,1 % auf 18,9 % (SE) zu verzeichnen.

CD103 gilt als „homing“-Rezeptor für die Verankerung im Oberflächenepithel. Die vermehrte Expansion dieser Subpopulation ist außerdem mit fibrogenen Prozessen assoziiert (Rhis et al. 1996, Braun et al. 2003). Die CD103-Expression auf CD4⁺-T-Lymphozyten ergab für vier Asthmatiker eine minimale Veränderung unter Interferon- α -Therapie. Demgegenüber wiesen zwei Patienten (AE, SE) nach 2 Monaten bzw. 6 Monaten einen erhöhten relativen Anteil CD103-exprimierender T-Lymphozyten von 99,9 % (AE) bzw. 84,0 % (SE) auf. Der Vergleich der Mediane (n = 6) von 0,9 % [0,4 - 2,6] vor und 0,6 % [0,2 - 1,1] nach 12 Monaten IFN- α -Therapie zeigt einen statistisch signifikanten Rückgang ($p < 0,05$) der CD103-Expression auf CD4⁺-T-Lymphozyten (Abb. 4.21C).

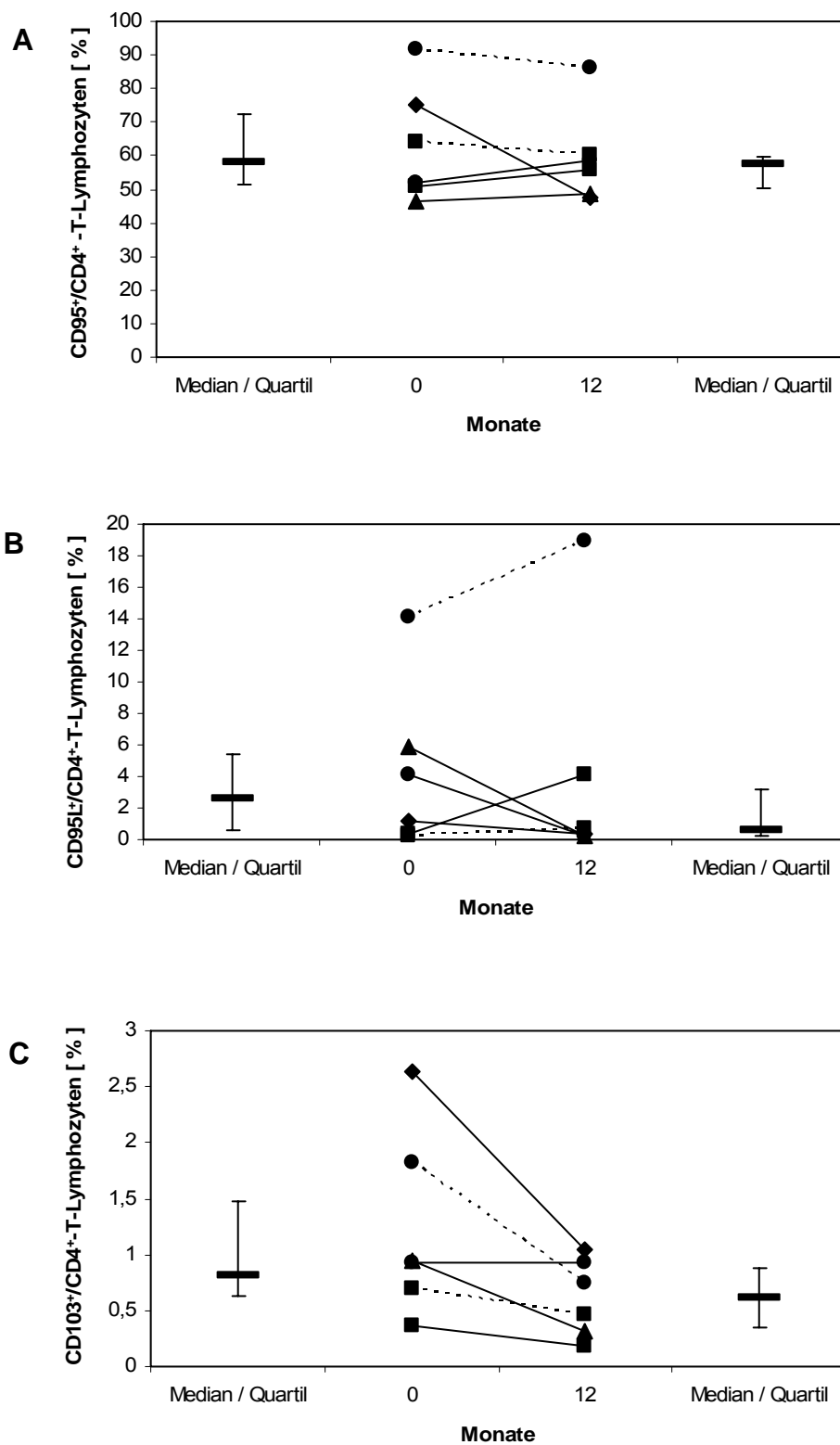


Abbildung 4.21: Relativer Anteil der Oberflächenantigene CD95, CD95L und CD103 auf CD4⁺-T-Lymphozyten unter IFN- α -Therapie. Die Abbildung zeigt den direkten Vergleich des relativen Anteils der CD95⁺/ (A), der CD95L⁺/ (B) sowie der CD103⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten (C) von 6 Asthmatikern vor und nach 12 Monaten IFN- α -Therapie. Darüber hinaus sind der Median und die 25 - 75%-Quartile eingetragen. Die Messwerte wurden durchflusszytometrisch bestimmt.

4.3.5 Intrazelluläre Zytokinexpression in CD4⁺-T-Lymphozyten

Th1- und Th2-Zellen können im Differentialblutbild nicht direkt bestimmt werden. Der indirekte Nachweis kann durchflusszytometrisch über das jeweilige Zytokinprofil der Th-Zellen geführt werden. Th1-Zellen produzieren Interleukin-2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Damit sind sie wesentlich für die Infektabwehr, Fremdgewebeerkenkung und Tumorzellvernichtung (Janeway und Travers 1995, Welte 2001). Th2-Zellen hingegen sezernieren vorzugsweise Interleukin 4 (IL-4), Interleukin 5 (IL-5), Interleukin 10 (IL-10) und Interleukin 13 (IL-13) und unterscheiden sich auf diese Weise funktionell vom Th1-Subtyp (Kroegel 2001). Die Ermittlung dieser Zytokine erfolgte durch die intrazelluläre Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD3, CD4 sowie CD8 und Anti-Zytokin-Antikörpern gegen IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ und TNF- α .

Für drei (SK, SE, ZM) der acht untersuchten Patienten war die Interleukinexpression über den Studienzeitraum von 12 Monaten nicht vollständig auswertbar. So standen die Messwerte von fünf Patienten für die statistische Auswertung zur Verfügung.

4.3.5.1 Th1-assoziierte Interleukine

IL-2 ist ein Th1-Zytokin mit einem breiten Wirkspektrum. So ist es für die klonale T-Zell-Expansion nach Antigenerkennung verantwortlich und beschleunigt die Apoptose von antigen-aktivierten Zellen. Weiterhin verstärkt IL-2 die Proliferation und Differenzierung von anderen Immunzellen, wie den NK-Zellen (Janeway und Travers 1995). Die IL-2-Proteinexpression in CD4⁺-T-Lymphozyten zeigte bei den Patienten (n = 5) unter Therapie variable Verläufe (Abb. 4.22A). Im direkten Vergleich der Messwerte vor und nach 12 Monaten IFN- α -Therapie wird für alle Patienten eine Expressionszunahme sichtbar. Im Median stieg die Expressionsdichte von 12,5 % [3,3 - 23,8] vor Therapie auf 26,9 % [12,5 - 34,8] nach 12 Monaten Behandlung (Abb. 4.22B). Diese Veränderung hat statistische Signifikanz ($p < 0,05$).

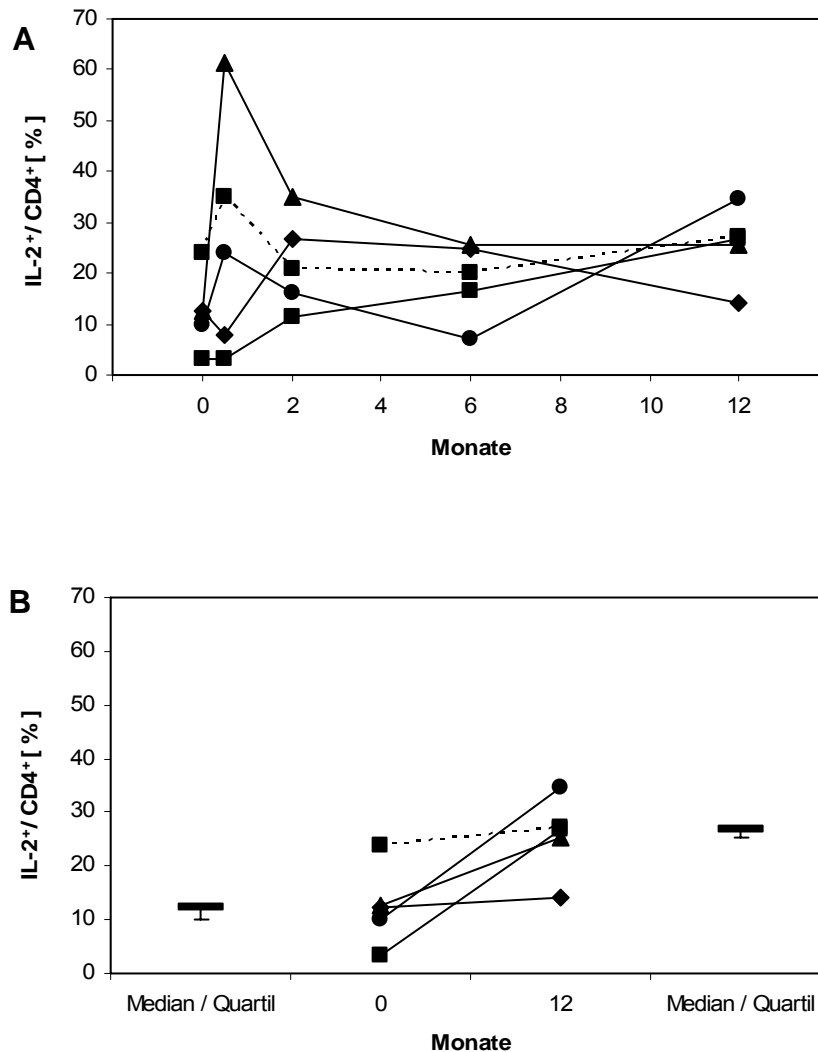


Abbildung 4.22: *Intrazelluläre IL-2-Proteinexpression in CD4⁺-T-Lymphozyten unter IFN- α -Therapie.* Die Darstellung zeigt den zeitlichen Verlauf der intrazellulären IL-2-Proteinexpression vor Therapie, nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten IFN- α -Behandlung (**A**). Abgebildet ist der direkte Vergleich der IL-2-Proteinexpression vor Therapie und nach 12 Monaten. Darüber hinaus sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für die beiden Messzeitpunkte eingetragen (**B**). Die Messwerte wurden für 5 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale durchflusszytometrisch ermittelt und sind in Prozent angegeben.

IFN- γ wird ausschließlich von Th1- und NK-Zellen gebildet (Janeway und Travers 1995). Es fördert die Th1-Differenzierung und hemmt die Differenzierung der Th2-Zellen (Coyle et al. 1996). Die intrazelluläre Proteinexpression von Interferon- γ in CD4⁺-T-Zellen nahm statistisch signifikant ($p < 0,05$) für die untersuchten Patienten ($n = 5$) im Median von 4,5 % [0,0 - 15,6] vor Therapie auf 11,3 % [4,6 - 34,0] nach 12 Behandlungsmonaten zu. Die IFN- γ -Proteinexpression erhöhte sich patientenbezogen unterschiedlich von 4,6 % (Minimum) bis zu 24,5 % (Maximum) (Abb. 4.23).

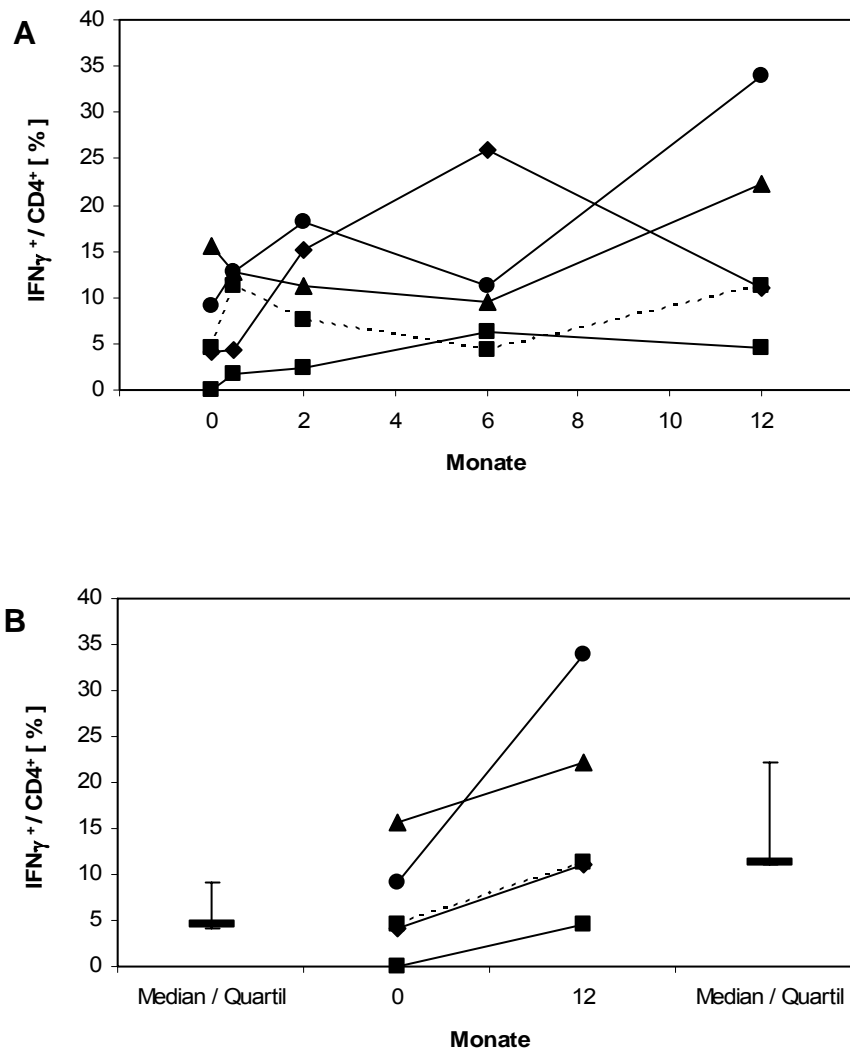


Abbildung 4.23: Intrazelluläre IFN- γ -Proteinexpression in CD4⁺-T-Lymphozyten unter der Behandlung mit IFN- α . Die Darstellung zeigt den zeitlichen Verlauf der intrazellulären IFN- γ -Proteinexpression vor Therapie, nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten IFN- α -Behandlung (A). Abgebildet ist der direkte Vergleich der IFN- γ -Proteinexpression vor Therapie und nach 12 Monaten Therapie. Darüber hinaus sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für die beiden Messzeitpunkte eingetragen (B). Die Messwerte wurden für 5 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale durchflusszytometrisch ermittelt und sind in Prozent angegeben.

TNF- α ist ein Th1-assoziiertes Zytokin, dem eine proinflammatorische Wirkung zugeschrieben wird (Choy und Panayi 2001). Die intrazelluläre TNF- α -Proteinexpression in CD4⁺-T-Lymphozyten stieg für die Patienten (n = 5) nicht signifikant ($p > 0,05$) von 12,9 % [0,0 - 33,3] vor Therapie auf 40,0 % [7,8 - 67,2] nach 12 Monaten Interferon- α -Behandlung an (Abb. 4.24B). Nur bei einem Patienten (MD) kam es unter IFN- α -Therapie zu einer Abnahme der TNF- α -Proteinexpression in CD4⁺-T-Lymphozyten von 33,3 % auf 17,2 % (Abb. 4.24A).

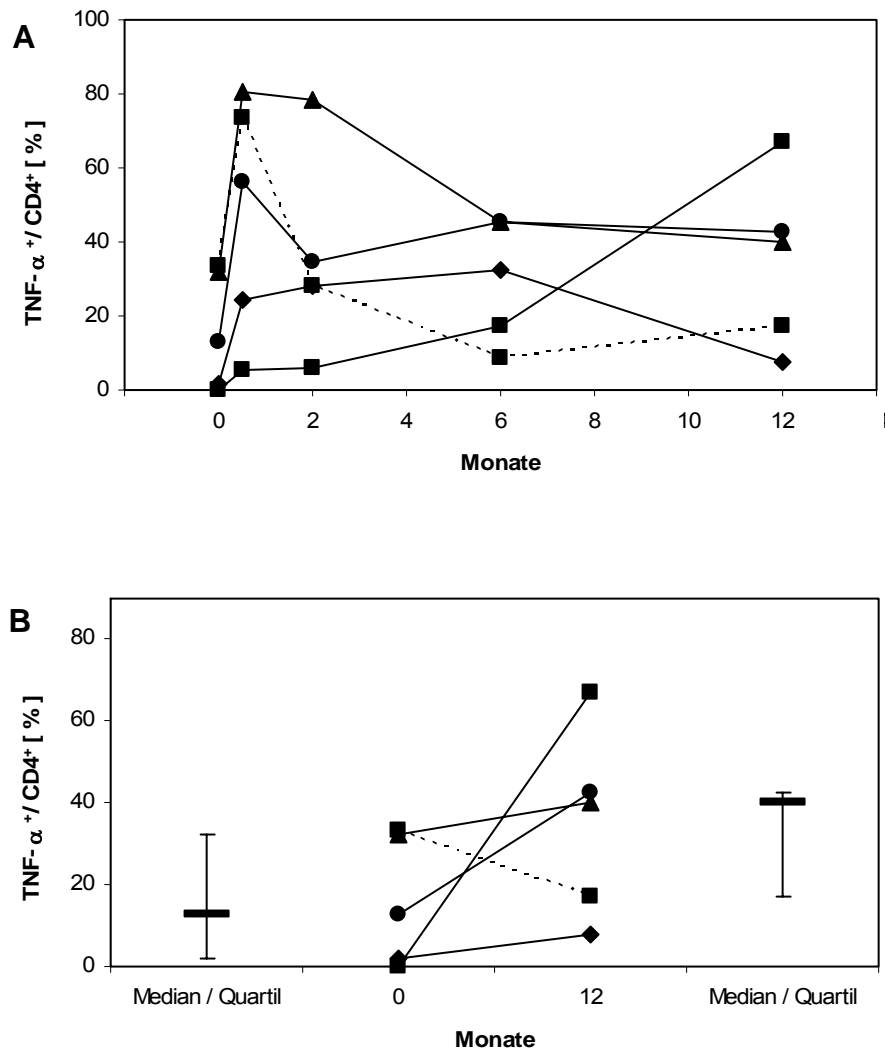


Abbildung 4.24: Intrazelluläre TNF- α -Proteinexpression in CD4⁺-T-Lymphozyten unter IFN- α -Therapie. Die Darstellung zeigt den zeitlichen Verlauf der intrazellulären TNF- α -Proteinexpression vor Therapie, nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten IFN- α -Behandlung (A). Abgebildet ist der direkte Vergleich der TNF- α -Proteinexpression vor Therapie und nach 12 Monaten Therapie. Darüber hinaus sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für die beiden Messzeitpunkte eingetragen (B). Die Messwerte wurden für 5 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale durchflusszytometrisch ermittelt und sind in Prozent angegeben.

4.3.5.2 Th2-assoziierte Interleukine

Th2-Zellen setzen ein definiertes Spektrum von Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13) frei. Die Synthese Th2-assoziierte Zytokine hat eine Reihe grundlegender pathologischer Konsequenzen für die asthmatische Entzündung (Kroegel 2001, Welte 2001).

IL-4 gilt als einer der wichtigsten Mediatoren für die Differenzierung von Th2-Zellen aus naiven Th0-Zellen. Darüber hinaus wirkt es als Antagonist der Effekte von IFN- γ und hemmt die Aktivierung von Th1-Zellen (Choy und Panayi 2001). Der Median für

die intrazelluläre IL-4-Protein-Expression der Patienten ($n = 5$) zeigt einen deutlichen, aber nicht signifikanten Anstieg ($p > 0,05$) von 0,2 % [0,0 - 47,6] vor Therapie auf 71,9 % [0,0 - 89,1] nach 12 Monaten IFN- α -Therapie (Abb. 4.25B). Die intrazelluläre IL-4-Proteinexpression nahm bei drei Patienten zu und blieb bei zwei Patienten (AE, FH) konstant niedrig (Abb. 4.25A).

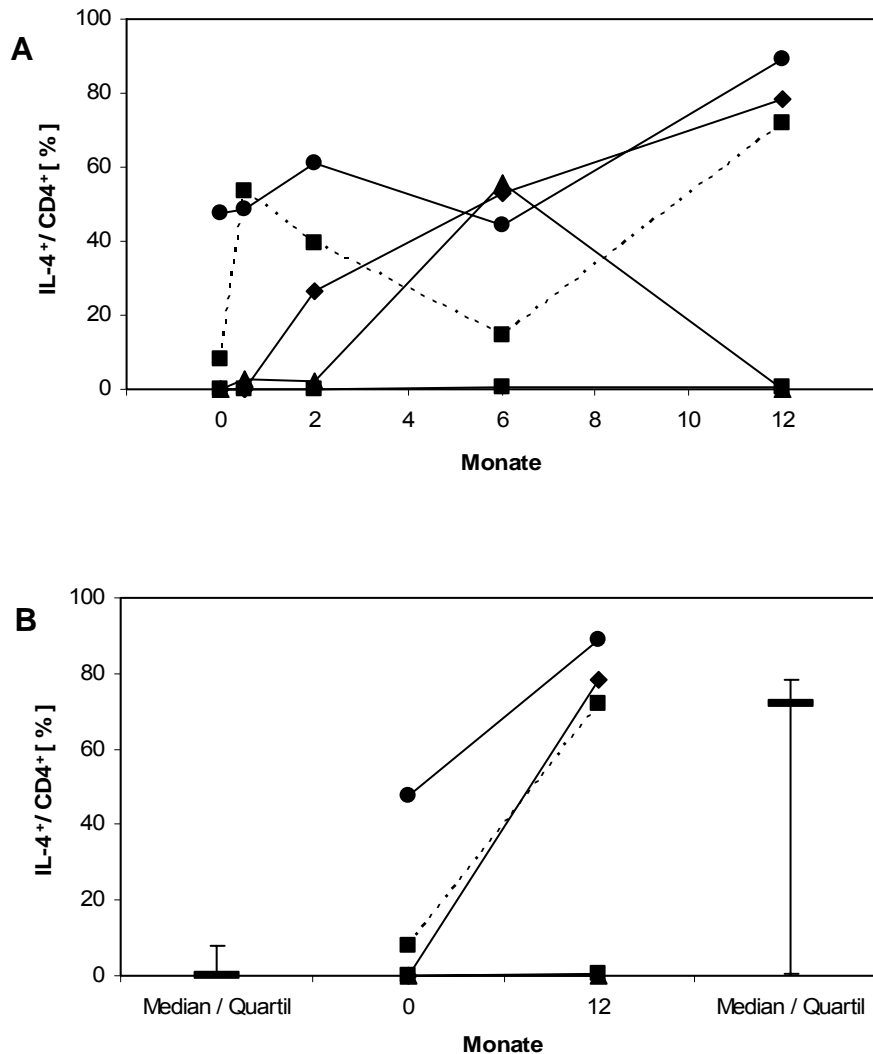


Abbildung 4.25: *Intrazelluläre IL-4-Proteinexpression in CD4⁺-T-Lymphozyten unter der Behandlung mit IFN- α .* Die Darstellung zeigt den zeitlichen Verlauf der intrazellulären IL-4-Proteinexpression vor Therapie, nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten IFN- α -Behandlung (A). Abgebildet ist der direkte Vergleich der IL-4-Proteinexpression vor Therapie und nach 12 Monaten Therapie. Darüber hinaus sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für die beiden Messzeitpunkte eingetragen (B). Die Messwerte wurden für 5 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale durchflusszytometrisch ermittelt und sind in Prozent angegeben.

IL-5 gilt als stärkster Aktivierungs- und Wachstumsfaktor des eosinophilen Granulozyten (Nolte 1995). Die intrazelluläre IL-5-Proteinexpression der Asthmatiker ($n = 5$) nahm unter Interferon- α -Therapie im Median nicht signifikant ($p > 0,05$) von 8,5 % [0,0 - 44,4] vor Therapie auf 27,6 % [0,0 - 78,1] nach 12-monatiger Behandlung zu (Abb. 4.26B). Der individuelle Verlauf ergab bei drei Patienten einen Expressionsanstieg, während zwei Patienten (FH, KE) eine deutliche Reduktion der intrazellulären IL-5-Proteinexpression erkennen ließen (Abb. 4.26A).

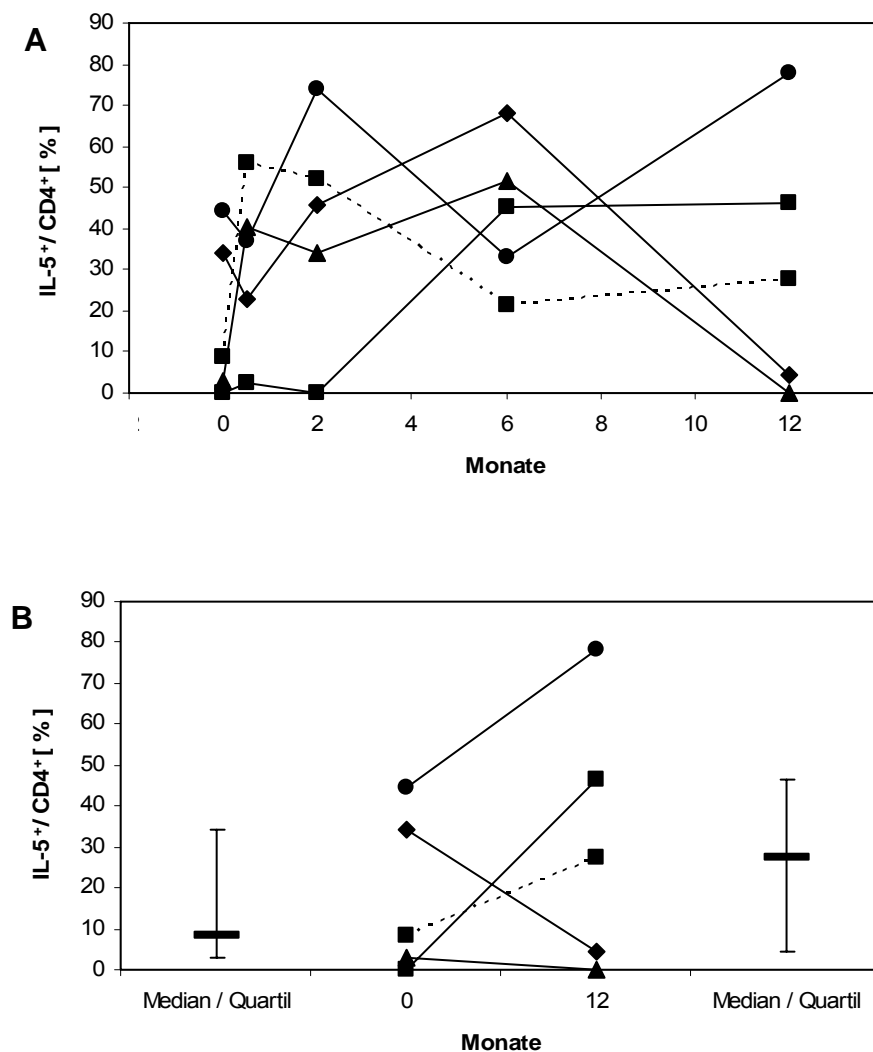


Abbildung 4.26: Intrazelluläre IL-5-Proteinexpression in CD4⁺-T-Lymphozyten unter IFN- α -Therapie. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der intrazellulären IL-5-Proteinexpression vor Therapie, nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten IFN- α -Behandlung (A). Die Abbildung zeigt den direkten Vergleich der IL-5-Proteinexpression vor Therapie und nach 12 Monaten Therapie. Darüber hinaus sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für die beiden Messzeitpunkte eingetragen (B). Die Messwerte wurden für 5 Asthmatiker durchflusszytometrisch ermittelt und sind in Prozent angegeben.

IL-10 wirkt als ein endogener Feedback-Mechanismus, um eine überschießende proinflammatorische Immunantwort zu inhibieren (Barnes 2000, Joos et al. 2004). Für einen der fünf Patienten waren die Messwerte für IL-10 über den Therapiezeitraum nicht reproduzierbar. Die intrazelluläre Interleukin-10-Proteinexpression nahm für die Patienten (n = 4) im Median von 6,2 % [1,6 - 98,9] vor Therapie auf 5,0 % [0,0 - 35,8] nach 12 Monaten IFN- α -Behandlung ab ($p > 0,05$) (Abb. 4.27B). Dabei war bei drei Patienten eine Expressionsabnahme und bei einem Patienten (KM) eine Expressionszunahme unter Therapie zu verzeichnen (Abb. 4.27A).

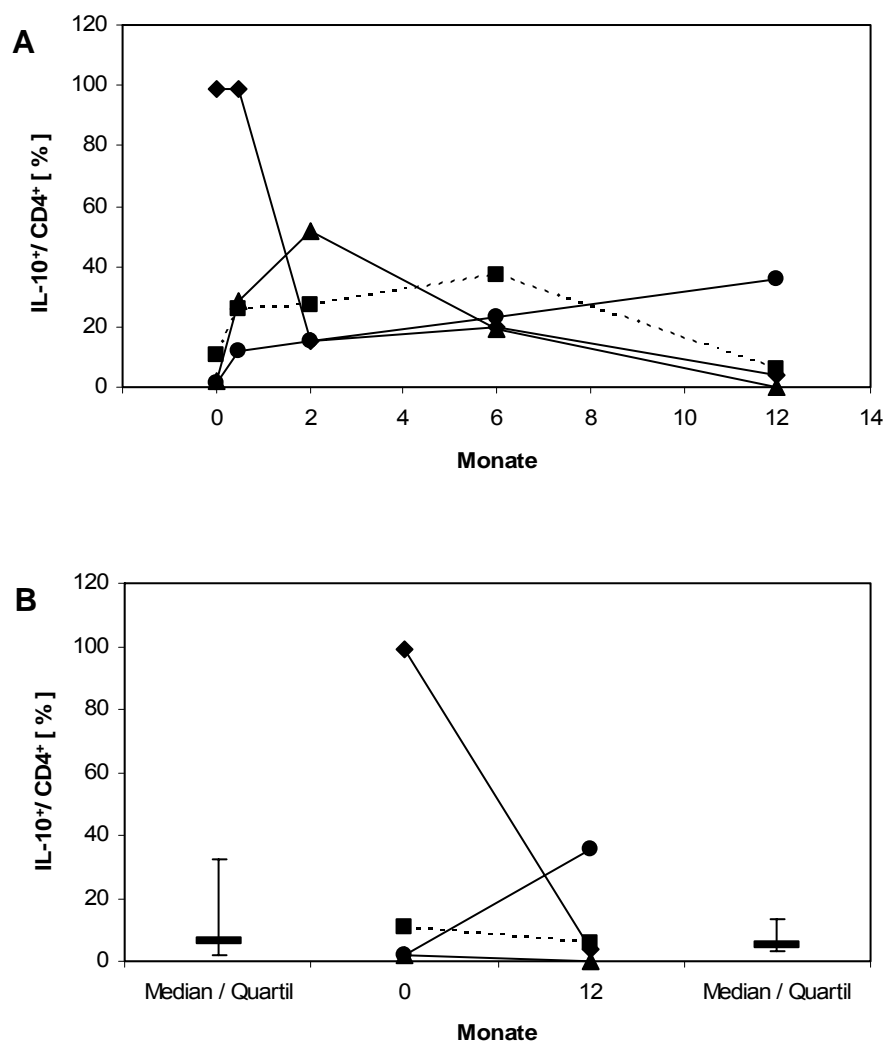


Abbildung 4.27: Intrazelluläre IL-10-Proteinexpression in CD4⁺-T-Lymphozyten unter IFN- α -Therapie. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der intrazellulären IL-10-Proteinexpression vor Therapie, nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten IFN- α -Behandlung (**A**). Die Abbildung zeigt den direkten Vergleich der IL-10-Proteinexpression vor Therapie und nach 12 Monaten Therapie. Darüber hinaus sind der Median und die 25 - 75%-Quartile für die beiden Messzeitpunkte eingetragen (**B**). Die Messwerte wurden für 4 Asthmatiker durchflusszytometrisch ermittelt und sind in Prozent angegeben.

4.3.5.3 Gegenüberstellung der Zytokinexpression

Für die Th1-assoziierten Interleukine IL-2, IFN- γ und TNF- α konnte nach 12 Monaten Interferon- α -Therapie eine Expressionserhöhung nachgewiesen werden, die für IL-2 und IFN- γ signifikant war (Abb. 4.28A). Demgegenüber waren bei den Th2-assoziierten Interleukinen IL-4, IL-5 und IL-10 keine signifikanten Veränderungen unter IFN- α -Therapie nachweisbar. Die Expression von IL-4 und IL-5 zeigte starke interindividuelle Schwankungen, so dass keine statistische Zunahme nachzuweisen war. Für IL-10 waren die geringsten Expressionsänderungen unter Therapie zu beobachten (Abb. 4.28B).

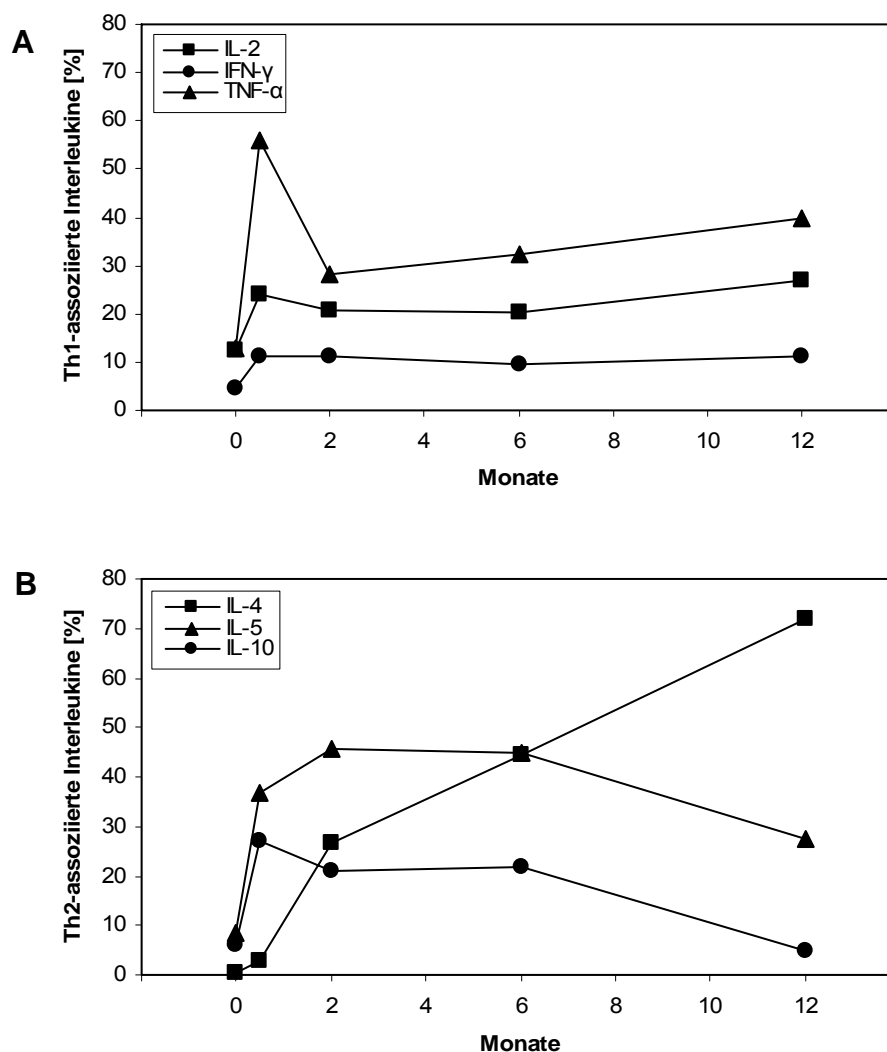


Abbildung 4.28: Intrazelluläre Proteinexpression ausgewählter Zytokine in CD4⁺-T-Lymphozyten unter IFN- α -Therapie. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Mediane der intrazellulären IL-2-, IFN- γ - und TNF- α -Proteinexpression (A) sowie der IL-4-, IL-5- und IL-10*-Proteinexpression (B) vor Therapie, nach 2 Wochen, 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten IFN- α -Behandlung. Die Messwerte wurden für 5 Asthmatiker durchflusszytometrisch ermittelt und sind in Prozent angegeben. (* Für die IL-10-Proteinexpression lagen Messwerte von 4 Asthmatikern zugrunde.)

5 Diskussion

Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale zeigen, trotz hoher systemischer Glukokortikoiddosen, einen instabilen und progredienten Krankheitsverlauf. Episodische Exazerbationen machen häufige notärztliche Interventionen und stationäre Krankenhausaufenthalte erforderlich. Klinisch imponiert eine schwergradig obstruktive Ventilationsstörung, die als „austherapiert“ angesehen wird. Diese Patienten sprechen auf adjuvante Therapien, wie beispielsweise Methotrexat, Cyclosporin oder kolloidale Goldpräparate nur unzureichend an (Seelbach et al. 2000). Die schweren und unerwünschten Nebenwirkungen der genannten Medikamente zwingen dazu, andere Therapieprinzipien beim schwergradig persistierenden Asthma bronchiale einzusetzen. Zur therapeutischen Wirkung einer auf die Modulation immunologischer Prozesse abzielenden Therapie mit Interferon- α gibt es nur begrenzte Erfahrungen. Diese basieren auf Kasuistiken der Behandlung von Patienten mit schwerem glukokortikoid-resistenten Asthma bronchiale und der Behandlung von Patienten mit Churg-Strauss-Syndrom.

5.1 Struktur und Funktion von Interferon- α

Interferone sind eine heterogene, den Zytokinen zugerechnete Gruppe von 20 Proteinen bzw. Glykoproteinen. Sie werden von Leukozyten und Fibroblasten als Reaktion auf eine Antigenexposition (z.B. Virusinfektion) gebildet und weisen antivirale, antitumorale und immunmodulatorische Effekte auf (Kraus und Wilms 2000).

Eine historische Einteilung der Interferone erfolgt nach ihrer Genstruktur in 4 Gruppen (Interferon- α , - β , - γ und - Ω) (Seelbach et al. 2000). Dabei wird zwischen Typ-1-(IFN- α , IFN- β und IFN- Ω) und Typ-2-Interferonen (IFN- γ) differenziert. Typ-1-Interferone umfassen mehr als 25 verschiedene α -Interferone sowie das β - und Ω -Interferon. Alle Typ-1-Interferone binden an einen gemeinsamen Rezeptor und induzieren so ihre antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Wirkung (DeMaeyer und DeMaeyer-Guignard 1998). Sie stimulieren die Expression von MHC Klasse I-Molekülen und die Aktivität von Memory-CD8⁺-Zellen (Weber und Thimme

2003). Typ-2-Interferone (IFN- γ) nutzen ein separates Rezeptorsystem (Antoniou et al. 2003). Sie werden indirekt von Th1-CD4⁺-Helferzellen und allen CD8⁺-Zellen nach Kontakt mit einer antigen-präsentierenden Zelle gebildet und sezerniert. IFN- γ definiert sich molekularbiologisch durch die Expression des Transkriptionsfaktors *T-bet* (Messi et al. 2003). IFN- γ wird vor allem durch IL-12 und IL-18 sekundär aus Entzündungszellen, wie T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen, freigesetzt (Neubert 2000).

Verschiedene In-vivo-Modelle des Asthma bronchiale belegen zudem, dass Typ-1- und Typ-2-Interferone definierte Komponenten der allergischen Entzündung hemmen. Hierzu zählen die IL-4- und IL-13-induzierte Genexpression in Monozyten und B-Zellen, die IL-5-Sekretion durch humane CD4⁺-T-Lymphozyten sowie die Synthese von IgE durch Plasmazellen (Raub et al. 1995). Darüber hinaus supprimieren Interferone die Rekrutierung von CD4⁺-T-Zellen und eosinophilen Granulozyten in die Atemwege sowie die Aktivierung von Eosinophilen und anderen Effektorzellen der asthmatischen Entzündung (Kroegel 2001).

5.2 Charakterisierung der therapeutischen Wirksamkeit von Interferon- α

Der therapeutische Einsatz von Interferonen, insbesondere Interferon- α , hat sich seit Anfang der 90er Jahre in der Behandlung chronischer Virusinfektionen sowie maligner Erkrankungen etabliert. Der antivirale Effekt von Interferon- α wird der Hemmung aller wichtigen Schritte des Virusreplikationszyklus zugeschrieben. Dazu gehören die Anheftung des Virus auf der Zielzelle, die Penetration, das Freilegen der viralen Proteine und Nukleinsäuren und schließlich der Zusammenbau und das Ausschleusen des kompletten Virus (Peters 1989). So besitzt IFN- α einen günstigen Effekt bei der Therapie der chronischen Hepatitis B und C (Kraus und Wilms 2000). Bei der chronisch myeloischen Leukämie, der Haarzell-Leukämie, dem kutanen T-Zell-Lymphom (Mucosis fungoides, Sezary-Syndrom), dem follikulären Non-Hodgkin-Lymphom, dem multiplen Myelom, dem malignen Melanom und dem Hypernephrom stellt Interferon eine Therapieoption dar (Antoniou et al. 2003). Weitere klinische Indikationen für rekombinantes IFN- α sind neuroendokrine Tumoren bzw. endokrine Pankreastumoren und das Kaposi-Sarkom bei AIDS-Patienten (Kraus und Wilms 2000).

Mit dem wachsenden Verständnis zur Pathogenese autoimmunologischer und allergischer Erkrankungen bildet das therapeutische Potenzial der Interferone auch auf diesem Gebiet einen Schwerpunkt bei der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien (Antoniou et al. 2003). So befassen sich Studien mit dem Einsatz von Interferon- α bei der Behandlung von multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis (Brod 2002). Verschiedene aktuelle Untersuchungen demonstrieren die klinische Wirksamkeit von Interferon- α bei anderen, mit Eosinophilie assoziierten Erkrankungen, wie dem Hypereosinophilen Syndrom (Aldebert et al. 1996, Butterfield und Gleich 1994) und dem Churg-Strauss-Syndrom (Mock et al. 1997, Tatsis et al. 1998, Reißig et al. 2003). Auch bei der Behandlung des schweren akuten respiratorischen Syndroms („severe acute respiratory syndrome“, SARS) finden sich Beobachtungen, dass Interferon- α ein wirksames therapeutisches Agens sein könnte (Hendry 2003, Loutfy et al. 2003). Studien an steroidresistenten Asthmatikern zeigen zudem den direkten antiasthmatischen Effekt von Interferon- α bei gleichzeitiger Erhöhung der Glukokortikoid-Sensitivität (Gratzl et al. 2000).

Die Ergebnisse aus der Vielzahl unterschiedlicher Studien am murinen und humanen Modell lassen auf eine antiinflammatorische und antiasthmatische Wirkung des Interferon- α schließen. Die verschiedenen Falldarstellungen legen nahe, dass die Behandlung mit Interferon- α bei schwerem kortisonabhängigem Asthma bronchiale die persistierenden Beschwerden und die Kontrolle der Erkrankung signifikant verbessern könnte (Gratzl et al. 2000, Haefner et al. 2001, Schmitz et al. 2001, Kroegel et al. 2001). Diese Feststellungen bildeten die Ausgangssituation für die hier vorgestellte klinische Untersuchung zur Wirksamkeit von Interferon- α bei schwergradig persistierendem Asthma bronchiale.

5.3 Klinische Effekte von Interferon- α bei der Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale

Die hier an acht Patienten durchgeführte Untersuchung zeigt, dass IFN- α über einen Zeitraum von 12 Monaten verabreicht, zu einer Verbesserung verschiedener, für das Asthma bronchiale relevanter Parameter führt. Hierzu gehören:

- die krankheitsbedingte Beeinträchtigung des körperlichen Befindens sowie der körperlichen Leistungsfähigkeit,
- die Häufigkeit von Asthmaanfällen, notärztlichen Interventionen und Hospitalisierungen,
- der Gebrauch von Bedarfsmedikamenten sowie
- die Entwicklung der statischen und dynamischen Lungenfunktionsparameter.

Ein wesentlicher Aspekt der vorliegenden Arbeit bestand in der Erfassung der Veränderung dieser klinischen Parameter.

5.3.1 Patientenbefinden und körperliche Leistungsfähigkeit

Zur Beurteilung der Lebensqualität der Patienten wurden definierte Kriterien (vgl. Abs. 3.13) analysiert, die neben der Lungenfunktionsmessung geeignet sind, den klinischen Verlauf des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale unter der IFN- α -Therapie darzustellen. Über die statistische Auswertung konnte eine dramatische Besserung der klinischen Symptome nachgewiesen werden. Der deutliche Rückgang von Krankenhausaufenthalten und notärztlichen Interventionen führte zu einer Normalisierung des Alltags der Patienten. Insbesondere der lebensbedrohliche Status asthmaticus trat unter IFN- α -Therapie nicht mehr auf. Die unter der Therapie verbesserte Nachtruhe hatte günstige Effekte auf die physische und psychische Konstitution, was zu einer Erhöhung der Lebensqualität der Patienten führte. Die signifikante Besserung der klinischen Symptome stellte sich bereits nach einer 2-monatigen Therapiedauer ein und blieb über den gesamten Studienzeitraum erhalten. Darüber hinaus konnten alle Patienten der Studie unter IFN- α -Therapie ihren PEF-Bestwert (vgl. Tab.4.2) steigern und die PEF Variabilität normalisieren. Für das therapeutische Potenzial von IFN- α spricht auch die positive Selbsteinschätzung der Patienten zur Veränderung ihrer Lebensqualität. Diese wurde erstmals in der vorliegenden Arbeit anhand eines Patientenfragebogens erfasst. So wurden Anforderungen des täglichen Lebens, wie An- und Auskleiden, Zähneputzen, Einkaufen oder Treppensteigen erfragt. Tätigkeiten, die vor der Therapie von den Patienten als extreme Anstrengung angegeben wurden und im Einzelfall gar nicht zu bewältigen waren, konnten bereits nach 2 Monaten IFN- α -Behandlung wieder ausgeübt werden (vgl. Tab. 4.1). Dies ließ sich erreichen,

obwohl bei den Patienten gleichzeitig die systemische Glukokortikoiddosis im Median signifikant reduziert wurde (vgl. Abs. 4.2.1).

Bei dieser schwersten Form des Asthma bronchiale muss jede Normalisierung im täglichen Leben der Patienten als ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung der IFN- α -Therapie angesehen werden. Das zentrale Ziel therapeutischer Maßnahmen ist eine Maximierung der Lebensqualität. Die in dieser Arbeit dokumentierten signifikanten Veränderungen belegen, dass die IFN- α -Therapie zu einem wesentlich kontrollierteren Verlauf der Erkrankung auf gesünderem Niveau mit verbesserter Lebensqualität führt. Die Abbildung 5.1 soll diese therapeutisch günstigen Effekte von Interferon- α grafisch verdeutlichen.



Abbildung 5.1: *Beeinflussung klinischer Komponenten des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale durch Interferon- α .*

Der therapeutische Effekt von IFN- α wird durch Studien zu den positiven klinischen und antiasthmatischen Effekten von Interferon- α bei der Behandlung von eosinophilen-assoziierten Erkrankungen, wie dem hypereosinophilen Syndrom (HES)

und dem Churg-Strauss-Syndrom bestätigt (Murphy et al. 1990, Zielinski und Lawrence 1990, Busch et al. 1991, Butterfield und Gleich 1994, Mock et al. 1997, Tatsis et al. 1998, Haefner et al. 2001, Reißig et al. 2003). Auch in Einzelfallstudien von Patienten mit schwerem glukokortikoid-resistenten Asthma bronchiale wird die markante Verbesserung der Schwere der Erkrankung sowie die Abnahme der Symptommhäufigkeit unter der IFN- α -Behandlung belegt (Seelbach et al. 1999, Gratzl et al. 2000, Kroegel et al. 2001, Schmitz et al. 2001). Insbesondere Seelbach et al. wiesen 1999 ebenfalls auf eine Besserung der nächtlichen Asthmasymptome und des damit verbundenen „Morgentiefs“, auf die Reduktion der notärztlichen Interventionen und der stationären Krankenhausaufenthalte hin.

Jedoch gibt es auch Fallberichte von Patienten unter Interferontherapie mit chronischer Hepatitis C Infektion bzw. idiopathischer Pulmonalfibrose, bei denen eine Exazerbation eines vorbestehenden Asthma bronchiale der IFN-Therapie zugeschrieben wird (Bini und Weinshel 1999, Honoré et al. 2003). Die Ursache für diese diskrepanten Ergebnisse ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Jedoch könnten unterschiedliche Applikationsformen, Dosis und Komorbidität der Patienten eine Erklärung hierfür bieten.

5.3.2 Lungenfunktion

Die Einschränkung der Lungenfunktion ist ein wichtiges diagnostisches Kriterium des Asthmaschweregrades (Corrigan et al. 1991). Die persistierende Atemwegsobstruktion wird insbesondere durch das so genannte Atemwegsremodelling hervorgerufen (Davies et al. 2003). Dieses ist durch eine Hyperplasie der glatten Muskel- und Drüsenzellen, eine Zerstörung und Desquamation des Bronchialepithels, eine von Eosinophilen dominierte Gewebeeinfiltration sowie eine Verdickung der bronchialen Basalmembran charakterisiert (Kuwano et al. 1993, Fish und Peters 1999, Kroegel 2002, Walsh et al. 2003). Die Möglichkeit der Rückbildung der Lungenfunktionseinschränkung ist abhängig von der frühzeitigen Erkennung und der adäquaten Behandlung dieser Remodellingprozesse (Selroos et al. 1995). Nach neueren Studien korreliert die Dauer der asthmatischen Erkrankung mit der Einschränkung der Lungenfunktion (Groenke et al. 2002). Bei einer kurzen Erkrankungsdauer steht die bronchiale Hyperreagibilität mit der Atemwegsentszündung im Vordergrund. Zusätzlich ist eine

lange Erkrankungsdauer von mehr als 16 Jahren mit einer kontinuierlichen Abnahme der Lungenfunktion verbunden (Groenke et al. 2002).

Die in die Studie aufgenommen Patienten wiesen eine Erkrankungsdauer im Median von 16 [5 - 24] Jahren auf. Bereits ab dem zweiten Therapiemonat mit IFN- α zeigten sich Verbesserungen der Lungenfunktionsparameter. Limitierend auf die Besserung der Lungenfunktion wirkt die individuelle Ausprägung des Atemwegsremodelling bei den einzelnen Patienten, die Entwicklungsunterschiede unter Therapie in der Patientengruppe erklärt. Für vier Patienten konnte eine kontinuierliche Besserung und Stabilisierung der FEV₁-Werte über den gesamten Therapiezeitraum verzeichnet werden. Davon erreichten zwei Patienten nach 12 Monaten Therapie FEV₁-Werte von über 100 %. Ein Patient mit einer sehr stark eingeschränkten Ausgangs-FEV₁ (31,0 %) zeigte im Verlauf variable FEV₁-Werte zwischen 41 % und 73 %. Im Median konnte unter Therapie eine markante Besserung der FEV₁ beobachtet werden.

Diese Daten bestätigen die Ergebnisse, die bei Lungenfunktionsuntersuchungen im Zusammenhang mit steroidresistentem Asthma bronchiale und Churg-Strauss-Syndrom unter Interferon- α Therapie beschrieben wurden (Tatsis et al. 1998, Seelbach et al. 1999, Gratzl et al. 2000, Haefner et al. 2001, Reißig et al. 2003). Hier wurde eine Verbesserung der FEV₁ von bis zu 294 % erzielt (Seelbach et al. 1999). In einer anderen Studie wurden 32 Patienten mit idiopathisch pulmonaler Fibrose für sechs Monate mit 200 µg IFN- γ 1b dreimal wöchentlich behandelt. Auch hier zeigte sich eine tendenzielle Besserung der FEV₁ sowie der alveolär-arteriellen Diffusion (Dauber et al. 2004). Im Zusammenhang mit der Verbesserung der FEV₁-Werte wird auf eine mögliche Erhöhung der Steroidsensitivität bzw. auf das Durchbrechen der Steroidresistenz durch IFN- α hingewiesen (Gratzl et al. 2000, Schmitz et al. 2001, Kroegel et al. 2002). Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt eine Studie an 30 Patienten mit mildem bzw. moderatem Asthma bronchiale. Die Patienten erhielten dreimal wöchentlich für 6 Monate intramuskulär (i.m.) 6 Millionen internationale Einheiten (IE) IFN- α zur Behandlung der chronischen Hepatitis C Virusinfektion (HCV). Dabei wird davon ausgegangen, dass die HCV-Infektion mit einer beeinträchtigten Ansprechbarkeit auf inhalative Glukokortikoide, wie Beclomethason, assoziiert ist. Die Behandlung mit IFN- α führte zu einem Wiederansprechen auf

Beclomethason. Dies äußerte sich in einer signifikanten Zunahme der prä- und postdilatorisch ermittelten FEV₁-Werte (Kanazawa et al. 2003).

In der vorliegenden Studie konnten fünf Patienten unter IFN- α -Therapie auf den Einsatz von Glukokortikoiden vollständig verzichten. Trotzdem wiesen diese Patienten eine deutliche Besserung der FEV₁ auf, die auch nach Beendigung der Glukokortikoideinnahme weiter bestand. Daraus kann postuliert werden, dass die Verbesserung der FEV₁ bei der IFN- α -Behandlung von Patienten mit Asthma bronchiale nicht nur, wie in den angeführten Studien gezeigt, auf ein erhöhtes Ansprechen auf Glukokortikoide zurückzuführen ist. Offensichtlich bewirkt IFN- α selbst einen krankheitslimitierenden Effekt, der an der Entwicklung der FEV₁ sichtbar gemacht werden kann. Auf diesen Sachverhalt wurde bereits in einer Kasuistik zur Behandlung eines CSS-Patienten hingewiesen (Reißig et al. 2003).

Die Aussagen zur Verbesserung der Lungenfunktion unter der IFN- α -Therapie werden durch die Veränderung des Tiffenau-Indexes gestützt. Bei fünf Patienten war eine 7 - 20%ige Verbesserung des Quotienten aus FEV₁/VC unter IFN- α -Therapie zu beobachten. Zwei Patienten mit bereits vor Therapie fast im Normbereich gelegenen FEV₁/VC-Quotienten zeigten nahezu keine Änderung unter Therapie. Nur ein Patient wies eine geringfügige Abnahme des Tiffenau-Indexes auf. Die Bestimmung des Residualvolumens (RV) ergab im Median einen statistisch nicht signifikanten Rückgang von 153,0 % [88,0 - 164,3] vor Therapie auf 129,4 % [84,9 - 203,9] nach 12 Monaten Behandlung. Nur bei einem Patienten war eine Zunahme des Residualvolumens (RV) zu verzeichnen. Für sieben der acht untersuchten Patienten konnte nach 12 Monaten Therapie eine Abnahme des Atemwegswiderstand (Raw) beobachtet werden. Die Ergebnisse der bodyplethysmographischen Lungenfunktionsmessung korrespondieren mit den Angaben der Patienten über die signifikante Besserung der Asthmabeschwerden. Nur bei einem Patient war zum Kontrolltermin 12 Monate eine Verschlechterung der Lungenfunktionsparameter zu beobachten. Ein Nichtansprechen der IFN- α -Therapie kann aber dennoch ausgeschlossen werden. Zum Messzeitpunkt 12 Monate bestand bei diesem Patienten ein bronchopulmonaler Infekt mit den entsprechenden Auswirkungen auf die Lungenfunktion. Aus den erhobenen Daten lässt sich ableiten, dass Interferon- α

zu einer Verbesserung der Lungenfunktion führt und einen protektiven antiasthmatischen Effekt besitzt.

5.3.3 Nebenwirkungen

Die Behandlung mit Interferon ist generell mit verschiedenen Nebenwirkungen assoziiert, die im Einzelfall den Erfolg einer Therapie begrenzen können. Es wird hierbei zwischen den frühen und den späten systemischen zytokininduzierten Nebenwirkungen differenziert. Kurz nach Therapieeinleitung obligat auftretende „grippeähnliche“ Symptome, wie Fieber, Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Kopfschmerz, Muskel- und Gelenkschmerzen, zählen zu den frühen systemischen Nebenwirkungen (Kraus und Wilms 2000). Diese sind in aller Regel dosisabhängig und lassen sich mit der prophylaktischen Gabe von Paracetamol oder dem Einsatz pegylierten Interferons (nur 1 Injektion/Woche) lindern. Sie klingen meist bei länger andauernder Therapie ab. In etwa 10 – 20 % der Fälle wird allerdings durch fortbestehende Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust und Hyperemesis eine Dosisreduktion oder sogar der Therapieabbruch notwendig. Während als späte systemische Nebenwirkung die Suppression der Hämatopoese dosisabhängig und gut kontrollierbar ist, wird die Toxizität auf das zentrale und periphere Nervensystem oft nicht frühzeitig erfasst. In 20 – 25 % der Fälle kann sich eine depressive Stimmungslage mit gesteigerter Ängstlichkeit und Gereiztheit entwickeln. Ferner können in 30 – 50 % kognitive Einschränkungen, wie etwa Konzentrations- und Merkfähigkeitsstörungen, auftreten. Selten entwickeln sich Polyneuropathien, Retinopathien und Delirium. Die frühen interferon-induzierten Nebenwirkungen sowie die Toxizität auf das hämatopoetische System und das zentrale Nervensystem sind nach Absetzen der Therapie reversibel (Kraus und Wilms 2000). Bei 20 – 50 % der mit Interferon behandelten Patienten lassen sich Autoantikörper wie ANA, SMA, TAK und MAK nachweisen. Autoimmunthyreopathien finden sich bei 5 – 8 % der Interferonpatienten. Diese entwickeln zumeist Frauen. Dabei tritt zu Therapiebeginn öfter eine hyperthyreote Stoffwechsellage, unter länger andauernder Therapie eine Hypothyreose auf. Diese sind jedoch gut behandelbar und stellen kein obligates Abbruchkriterium für die Therapie dar (Kraus und Wilms 2000). Seltener kann sich ein insulinpflichtiger Diabetes mellitus oder andere Autoimmunerkrankungen, wie systemischer Lupus erythematodes (SLE), Raynaud-Syndrom, Autoimmunvaskulitis, rheumatoide Arthritis oder bullöses Pemphigoid, entwickeln. Insbesondere sollten synergistische Effekte von Interferon- α mit systemischen Glukokortikoiden

berücksichtigt werden, die zu einem zellulären und humoralen Immundefekt führen können (Seelbach et al. 1999). Bei älteren Patienten mit vorbestehender koronarer Herzkrankheit bzw. Kardiomyopathien sollte auf eine mögliche kardiale Toxizität geachtet werden (Kraus und Wilms 2000).

Bei allen Patienten der vorliegenden Studie traten Nebenwirkungen, wie Fieber, Gelenk- und Muskelschmerzen, Inappetenz und Emesis, 2 bis 12 Stunden nach der Interferoninjektion auf. Diese erwiesen sich jedoch als transient und bildeten sich bei fünf der Patienten nach dem ersten Behandlungsmonat zurück. Bei drei Patienten bestanden diese Nebenwirkungen für mehrere Monate fort und führten zu einer Veränderung der Dosierung. Unter der IFN- α -Therapie entwickelten drei Patienten eine Autoimmunthyreoiditis, die mit L-Thyroxin in angepasster Dosierung gut kontrolliert werden konnte und eine Weiterführung der Behandlung nicht beeinträchtigte. Bei der Behandlung von Patienten mit steroidresistentem Asthma bronchiale mit IFN- α traten Leukopenien, Neutropenien und erhöhte Leberenzymaktivitäten auf, die sich nach Dosisreduktion oder Absetzen von IFN- α rückläufig zeigten (Seelbach et al. 2000). Diese späten systemischen Nebenwirkungen traten während des Studienzeitraumes von 12 Monaten bei keinem der in der vorliegenden Studie untersuchten Patienten auf. Dieser Sachverhalt kann im Zusammenhang mit der geringeren Dosierung des Medikamentes ($3 \times$ wöchentlich 6 Millionen IE s.c. versus $3 \times$ wöchentlich 3 Millionen IE s.c.) stehen. Anhaltende Übelkeit und depressive Stimmungslage führte bei drei Patienten zur Therapieeinstellung und zum Studienausschluss (Tab. 3.1). Bei zwei dieser Patienten kann dabei eine psychische Komponente für den Therapieabbruch nicht ausgeschlossen werden, da sie das Präparat Inferax[®] nur über einen sehr kurzen Zeitraum (2 bzw. 4 Wochen) eingenommen haben.

5.4 Pharmakologische Effekte von Interferon- α bei der Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale

Glukokortikoide sind die potentesten, derzeit verfügbaren antientzündlichen Medikamente. Das Ergebnis ihrer pharmakologischen Wirkung ist ein ausgeprägter antiinflammatorischer Effekt auf verschiedenen Ebenen der dem Asthma bronchiale zugrunde liegenden zellulären Prozesse (Kroegel 2002). Die Glukokortikoiddauertherapie ist für den Patienten jedoch mit ernsthaften und

irreversiblen Nebenwirkungen verbunden. Ein wesentliches Anliegen der Entwicklung neuer Therapieansätze für die Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale besteht deshalb in der drastischen Senkung oder völligen Einsparung oraler Glukokortikoide.

Mit der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass sich unter Therapie mit Interferon- α bei Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale systemische Glukokortikoide bei gleichzeitig verbesserter Kontrolle der Erkrankung reduzieren bzw. völlig einsparen lassen. Die Reduktion der Glukokortikoiddosis war bereits unmittelbar nach Einleitung der Therapie bei allen Patienten möglich. Von 17,5 mg/d vor Therapie betrug die Dosis nach 2 Monaten noch 7,6 mg/d, nach 6 Monaten 5,0 mg/d und nach 12 Monaten Interferon- α -Therapie nur noch 2,0 mg/d. In fünf Fällen war es sogar möglich, die orale Glukokortikoidtherapie ganz zu beenden. Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits in Kasuistiken zur therapeutischen Wirksamkeit der Behandlung des Churg-Strauss-Syndroms (CSS) mit Interferon beschrieben. In einer Untersuchung reduzierten drei von vier CSS-Patienten ihre orale Glukokortikoiddosis von 15 – 50 mg/d vor Therapie auf 5 mg/d unter der Behandlung mit Interferon- α . Einem Patienten war es möglich, vollständig auf die tägliche Einnahme oraler Glukokortikoide zu verzichten (Tatsis et al. 1998). Eine andere Arbeit berichtet von zwei Churg-Strauss-Patienten, die die Glukokortikoidtherapie von 10 - 50 mg/d unter der Behandlung mit IFN- α beenden konnten (Reißig et al. 2003).

Parallel zu den Glukokortikoiden verringerte sich bei allen Patienten der vorliegenden Studie auch der Einsatz inhalativer kurz-wirksamer β_2 -Mimetika, was für eine verbesserte Kontrolle der Erkrankung unter Interferon spricht. Außerdem kann dies als Zeichen einer gestiegenen physischen und psychischen Belastbarkeit der Patienten unter IFN- α -Therapie gewertet werden.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass Interferon- α zu einer Stabilisierung der Erkrankung in mehrfacher Hinsicht führt. Hierzu gehört die Reduktion der Häufigkeit von Notfallinterventionen, der Zahl der asthmabedingten Hospitalisierungen, der täglichen und nächtlichen Asthmaattacken sowie des Bedarfs an Notfallspray und systemischen Glukokortikoiden. Im sich anschließenden

Abschnitt der Arbeit wird untersucht, welche immunologischen Veränderungen möglicherweise hierfür verantwortlich sind.

5.5 Immunologische Effekte von Interferon- α bei der Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale

Der immunologische Effekt von Interferon- α bei der Behandlung des schwergradig persistierenden Asthmas lässt sich nach Effektorzellen und Regulatorzellen differenzieren. Insgesamt ergaben sich einige, zum Teil signifikante Veränderungen, zu denen unter anderem die Vermehrung der NK-Zellen und CD4⁺-T-Lymphozyten und die Verminderung der eosinophilen Granulozyten, γ/δ -T-Zellen und B-Zellen gehört. Diese Veränderungen sind zum Teil noch nicht zu erklären. Erschwerend bei der Interpretation der Ergebnisse kommt hinzu, dass vergleichbare Studien auf der Untersuchung der Zellen des Bronchialgewebes und nicht auf der Untersuchung von Zellen des peripheren Blutes basieren. Trotzdem lassen sich einige Schlussfolgerungen ziehen und mögliche Mechanismen entwickeln. Hierzu wird nachfolgend die mögliche Bedeutung der Zellveränderungen diskutiert.

5.5.1 Einfluss auf Effektorzellen

Unter Effektorzellen versteht man entdifferenzierte Zelltypen, die am distalen Ende der Immunreaktion den proentzündlichen Effekt der Immunreaktion am Zielorgan über verschiedene pharmakologische und zytotoxische Mechanismen vermitteln (Kroegel 2002). Die vorliegende Arbeit konzentriert sich in diesem Abschnitt auf die Haupteffektorzelle des Asthma bronchiale, den eosinophilen Granulozyten. NK-Zellen und γ/δ -T-Zellen wurden numerisch erfasst.

Asthma bronchiale ist eine chronische Atemwegsentzündung, die durch eine prominente bronchiale Infiltration von eosinophilen Granulozyten gekennzeichnet ist (Bousquet et al. 1990, Kroegel et al. 1994). Dabei kommt dem Eosinophilen und seinen sezernierten Mediatoren eine zentrale Rolle als Effektorzelle bei der Pathogenese des Asthma bronchiale sowie dem Remodelling der Atemwege zu (Kroegel 2002, Walsh et al. 2003). Er bildet ein großes Spektrum an Lipidmediatoren, wie PAF und PGE₂, an Zytokinen, wie IL-3, IL-5, an Granulozyten- und Makrophagenkoloniestimulierenden Faktoren („granulocyte and macrophage colony-stimulating factor“, GM-CSF), basischen Proteinen und Sauerstoffradikalen. Diese

Substanzen zeigen zytotoxische Effekte auf die Bronchialepithelzellen des Asthmikers (Bousquet et al. 1990, Kroegel et al. 1994). Sie sind auch in der Lage, Mastzellen, CD4⁺-T-Lymphozyten und Thrombozyten im asthmatischen Geschehen zu aktivieren (Busse und Lemanske 2001, MacKenzie et al. 2001, Kroegel 2002). Für die Reifung und Freisetzung des Eosinophilen aus dem Knochenmark sind IL-3, IL-5 und GM-CSF verantwortlich (Busse und Lemanske 2001, Hellman et al. 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Interferon- α einen anti-inflammatorischen Effekt besitzt, der sich durch seine Wirkung auf die Zahl der Eosinophilen demonstrieren lässt. Die im Rahmen der Studie untersuchten acht Patienten zeigten vor Therapiebeginn eine erhöhte Zahl eosinophiler Granulozyten im peripheren Blut. Die Behandlung mit IFN- α führte in den ersten 6 Monaten zu einer signifikanten Abnahme der Eosinophilenzellzahl im Median von 0,46 [0,05 – 0,74] Gpt/l auf 0,18 [0 – 0,41] Gpt/l. Obwohl nach dem 6. Therapiemonat die Zahl der Eosinophilen wieder zunahm, war ihre Anzahl nach 12 Monaten IFN- α -Behandlung deutlich geringer als vor Therapie (Abb. 5.2).

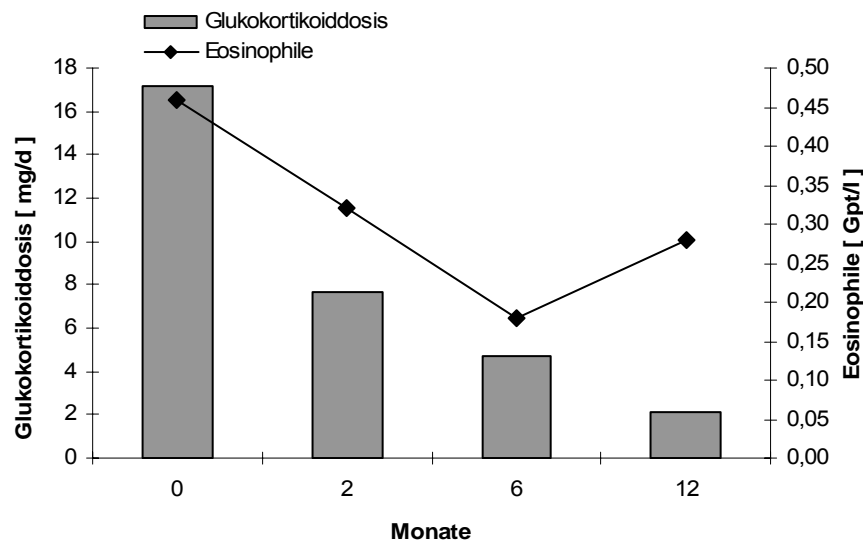


Abbildung 5.2: Beziehung zwischen der Eosinophilenzellzahl und der Reduktion der oralen Glukokortikoideinnahme unter Interferon- α -Therapie. Dargestellt sind der Median der oralen Glukokortikoiddosis in mg/d sowie der Eosinophilenzellzahl in Gpt/l von 8 Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale vor sowie nach 2 Monaten, 6 Monaten und 12 Monaten IFN- α -Therapie.

Glukokortikoide induzieren eine Apoptose sowohl von Blut- (Meagher et al. 1996) als auch Gewebseosinophilen (Saunders et al. 1999). Die Eosinophilenzahl reagiert auf

die therapeutische Applikation von Glukokortikoiden in nahezu dosisabhängiger Form (Kroegel 2002, Hamelmann und Schleimer 2003, Walsh et al. 2003). Daher muss bei der Bewertung der Entwicklung der Eosinophilenzahl in der vorliegenden Untersuchung, die gleichzeitig erfolgte, signifikante Senkung der oralen Glukokortikoiddosis unter IFN- α -Therapie berücksichtigt werden (vgl. Abb. 5.2). Die Veränderungen bis zum 6. Therapiemonat deuten darauf hin, dass sich bei Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale Interferon- α und Glukokortikoide synergistisch ergänzen. Wie in Einzelfallstudien zur Behandlung von Patienten mit steroidresistentem Asthma bronchiale und Churg-Strauss-Syndrom beschrieben, kann Interferon- α eine Verbesserung der Steroidsensitivität bewirken bzw. die Steroidresistenz wirksam durchbrechen (Gratzl et al. 2000, Schmitz et al. 2001, Kroegel et al. 2002). Darüber hinaus wurde für diese Patienten unter Interferon- α -Therapie eine anhaltende Normalisierung der Eosinophilenzahl nachgewiesen (Tatsis et al. 1998, Seelbach et al. 1999, Gratzl et al. 2000, Reißig et al. 2003). So kann in der vorliegenden Untersuchung die signifikante Abnahme der Eosinophilenzellzahl bis zum 6. Therapiemonat zum Teil auf eine erhöhte Steroidsensitivität der Patienten unter IFN- α -Therapie zurückgeführt werden. Die nach 12 Monaten Interferon- α -Therapie verminderte Eosinophilie lässt darauf schliessen, dass IFN- α selbst einen eosinophilen-senkenden Effekt bei Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale induziert.

Diese Wirkung von Interferon- α könnte in kausalem Zusammenhang mit dem auf der Oberfläche von eosinophilen Granulozyten identifizierten Rezeptor für IFN- α stehen. An Patienten mit Hypereosinophilem Syndrom (HES) konnte die inhibierende Rolle von Interferon- α auf die Freisetzung wichtiger Mediatoren, wie IL-5, Eosinophiles Cationisches Protein (ECP) und Neurotoxin (EDN) nachgewiesen werden (Aldebert et al. 1996). Die Daten der vorliegenden Arbeit zur Therapie des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale unterstützen die These des direkten rezeptorvermittelten Einflusses von Interferon- α auf eosinophile Granulozyten. Ferner besteht die Möglichkeit, dass Interferon- α indirekt, über eine Expressionserhöhung von IFN- γ , Einfluss auf die Zahl der eosinophilen Granulozyten nehmen kann. So führt der therapeutische Einsatz von Chitosan IFN- γ -pDNA Nanopartikeln im Mausmodell zu einer signifikanten Abnahme der Eosinophilenzahl (Kumar et al. 2003). In sensibilisierten Tieren hemmt die Inhalation von IFN- γ die

Infiltration der Atemwege durch eosinophile Granulozyten (Satoh et al. 1999). Obwohl dieser Effekt bisher beim Menschen nicht nachweisbar war (Boguniewicz et al. 1995), kann diese mögliche Wirkung von Interferon- α auf die Eosinophilenzahl nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Interferon- α einen eosinophilen-reduzierenden Effekt im peripheren Blut von Asthmatikern mit schwergradig persistierender Erkrankung induziert und eine dauerhafte Normalisierung der Eosinophilenzellzahl bewirken könnte. Dieses Ergebnis der Studie kann als Erklärungsansatz für die unter Punkt 5.3 diskutierte signifikante Besserung der Asthmasymptomatik und der Kontrolle der Erkrankung unter der Therapie mit Interferon- α herangezogen werden.

Wenn Interferon- α die Zahl der eosinophilen Granulozyten reduziert, stellt sich die Frage, ob sich dies auch am Phänotyp ablesen lässt. Zur Charakterisierung des Phänotyps des eosinophilen Granulozyten erfolgte die Bestimmung der Expression relevanter Oberflächenantigene (vgl. Abs. 4.3.2).

Für CD69 konnte in der vorliegenden Studie eine Zunahme der Expression beobachtet werden. CD69 ist ein Typ II integrales Membranglykoprotein und gehört zur C-Typ Lectin Superfamilie (Lopez Cabrera et al. 1993). Dieser Oberflächenmarker wird von einer Reihe von Zellen exprimiert. Eigene Studien zeigten, dass naive eosinophile Granulozyten des peripheren Blutes das CD69-Antigen nicht exprimieren (Foerster et al. 2002). Im Gegensatz dazu repräsentieren die aus der BAL-Flüssigkeit von Patienten mit Asthma bronchiale und eosinophiler Pneumonie gewonnenen Eosinophilen das CD69-Antigen auf ihrer Zelloberfläche (Nishikawa et al. 1992, Hartnell et al. 1993, Kroegel et al. 1996, Foerster et al. 2002). Dies lässt vermuten, dass es sich bei dem CD69-Antigen um einen Aktivierungsmarker auf humanen Eosinophilen handelt (Matsumoto et al. 1998, Foerster et al. 2002, Walsh et al. 2003). Dabei wird davon ausgegangen, dass bei der Passage des Eosinophilen vom Blut ins Bronchialgewebe bestimmte Modifikationen des Phänotyps des eosinophilen Granulozyten stattfinden (Dallaire et al. 2002). Durch die Stimulation mit IL-3, IL-5, GM-CSF und Interferon- γ in vitro wird die Expression von CD69 auf eosinophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut

erhöht und das Überleben dieser Zellen verlängert (Hartnell et al. 1993, Matsumoto et al. 1998, Foerster et al. 2002). CD69 scheint auf eosinophilen Granulozyten an der Regulation der Viabilität über die Induktion der Apoptose beteiligt zu sein (Walsh et al. 1999, Foerster et al. 2002).

Die Resultate der vorliegenden Studie belegen eine tendenzielle Zunahme der CD69-Expression auf eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut bei den Patienten nach 12-monatiger Therapie mit Interferon- α . Die erhöhte CD69-Expression kann Folge der gestiegenen IFN- γ -Konzentration unter Therapie mit IFN- α sein (vgl. Abs. 4.3.5.1). Sie könnte aber auch ein Indiz dafür sein, dass Interferon- α durch einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Interferon- γ einen direkten Einfluss auf die CD69-Expression ausübt. Die Messwerte der vorliegenden Arbeit stimmen mit In-vitro-Studien überein, nach denen IFN- α direkt oder indirekt über IFN- γ -Anstieg die CD69-Expression auf eosinophilen Granulozyten erhöht (Foerster et al. 2002). Die erhöhte CD69-Expression in der vorliegenden Studie muss zunächst als Aktivitätszunahme des eosinophilen Granulozyten interpretiert werden. Die Ligandierung von CD69 induziert Apoptose in aktivierten eosinophilen Granulozyten (Foerster et al. 2002, Matsumoto et al. 1998, Walsh et al. 2003). Darin besteht ein wichtiger Unterschied zu CD95, das Apoptose in nahezu allen Zelltypen vermittelt (Hagimoto et al. 1997, Foerster et al. 2002). Eigene Studien, die diese spezifische Apoptoseinduktion durch CD69 beschreiben, sehen im Einsatz von Anti-CD69-Antikörpern eine viel versprechende therapeutische Perspektive zur Behandlung von mit Eosinophilie assoziierten Erkrankungen (Foerster et al. 2002). Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit lässt daher vermuten, dass die Kombination von Interferon- α -Therapie mit einer Anti-CD69-Antikörper-Therapie einen weiteren eosinophilen senkenden Effekt bei Asthmatikern bewirken könnte.

Bei CD95 handelt es sich um ein Typ-I-integrales Membranprotein mit 45 kDa Molekulargewicht, das zu den bestuntersuchtesten Apoptoserezeptoren zählt. Durch Interaktion mit dem CD95-Liganden führt der CD95-Rezeptor zu einer Apoptose, wenn auch nicht in allen Zelltypen (Trauth et al. 1989). Eine reduzierte Apoptose in Eosinophilen aus dem Sputum von Asthmatikern korreliert signifikant mit dem Asthmaschweregrad, definiert durch Atemwegsobstruktion und Symptommhäufigkeit (Duncan et al. 2003). Eigene Studien zeigten, dass die Th1-assoziierten Zytokine

IFN- γ und TNF- α durch synergistische Effekte zu einer erhöhten Oberflächenexpression von CD95 auf eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut führen (Luttmann et al. 1998). Da IFN- γ und TNF- α im Rahmen der asthmatischen Entzündung vermindert freigesetzt werden, könnte das eine Störung des Apoptosemechanismus und damit eine Akkumulation eosinophiler Granulozyten bewirken (Kroegel et al. 1996). Die bei den Patienten unter IFN- α -Therapie ermittelte Zunahme der Expression der Th1-assoziierten Zytokine IFN- γ (signifikant) und TNF- α (vgl. Abs. 4.3.5.1) lässt auch eine vermehrte Expression von CD95 vermuten. Im Gegensatz dazu war in der Studie eine tendenzielle Abnahme der CD95-Expression nach 12 Monaten Therapie zu beobachten. Aus den vorliegenden Daten kann eine Veränderung der Expressionsdichte des CD95-Antigens, die auf den Einfluss von Interferon- α zurückzuführen ist, nicht abgeleitet werden. Dieses Ergebnis korrespondiert nicht mit den bisherigen Studien. Es unterstreicht aber die Bedeutung des speziellen Apoptoseinduktors CD69 auf eosinophilen Granulozyten für die Entwicklung antiasthmatischer Therapien.

Der Expression von CD44 auf eosinophilen Granulozyten wird eine wichtige Rolle bei der Infiltration des Eosinophilen in das entzündliche Lungengewebe von Asthmatikern zugeschrieben (Kato et al. 1999). Dabei tritt das CD44-Antigen mit extrazellulären Matrixkomponenten, wie dem Glykosaminoglykan Hyaluronan in Interaktion (Kincade et al. 1997, Sheikh et al. 1998). Der genaue Mechanismus ist dabei allerdings noch weitgehend unklar. Bei Asthma bronchiale Patienten fand sich eine signifikant erhöhte CD44-Expression auf eosinophilen Granulozyten des Sputums (Sano et al. 1997). Die Akkumulation eosinophiler Granulozyten im Lungengewebe ist verbunden mit einer verstärkten bronchialen Hyperreagibilität sowie dem Remodelling der Atemwege. Eine Studie an Patienten mit eosinophiler Pneumonie (EP) kam zu vergleichbaren Beobachtungen. Sie zeigte eine erhöhte Expression von CD44 auf Alveoläreosinophilen (Kato et al. 1999). In der vorliegenden Studie nahm die CD44-Expression auf eosinophilen Granulozyten tendenziell nach 12 Monaten IFN- α -Therapie ab. Aus dem Ergebnis könnte gefolgert werden, dass die unter Interferon- α reduzierte CD44-Expression auch zu einer verminderten Transmigration der Bluteosinophilen in das Bronchiale Gewebe führt (Abb. 5.3).

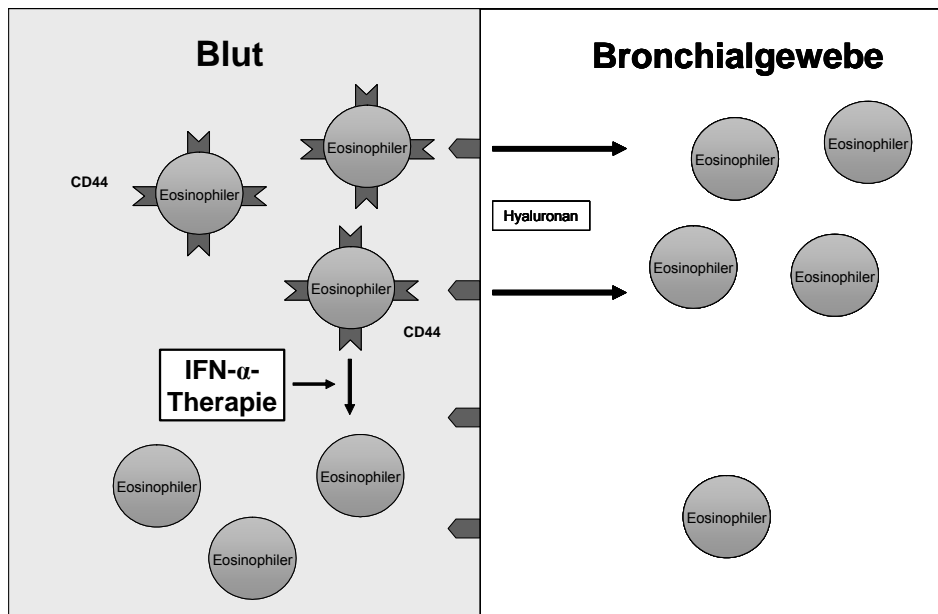


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung möglicher Effekte von Interferon- α auf die Transmigration von Bluteosinophilen in das Bronchialgewebe.

Natürliche Killer (NK)-Zellen sind als Ausdruck einer lymphozytären Aktivierung vermehrt im peripheren Blut nachweisbar. Ihre Proliferation unterliegt der Regulation durch T-Lymphozyten, ihre Aktivität und Zytotoxizität wird durch Interferon erhöht (Kroegel 2002). Sie sind Hauptproduzenten von Interferon- γ im Rahmen der immunologischen Abwehr (Suzue et al. 2003). Letztlich ist ihre Funktion beim Asthma bronchiale noch nicht eindeutig definiert. In der vorliegenden Studie war eine nicht signifikante Zunahme der NK-Zellpopulation im Blut zu beobachten. Dieser Effekt von Interferon- α auf diesen Zelltyp wurde bereits bei der Behandlung von Patienten mit steroidresistentem Asthma bronchiale beschrieben (Gratzl et al. 2000). Die Vermehrung der NK-Zellen kann als Ursache oder auch Wirkung der Verschiebung der Th1/Th2-Dysbalance zugunsten der Th1-Zelle diskutiert werden. Erhöht Interferon- α direkt den relativen Anteil der NK-Zellen, so könnten diese über die Produktion von Interferon- γ und anderer Mediatoren die Immunantwort zugunsten der Th1-Antwort modulieren (Moretta et al. 2002). Andererseits kann die vermehrte NK-Zellpopulation Resultat der Th1/Th2-Verschiebung durch die IFN- α -Therapie sein. Es kann aber auch vermutet werden, dass beide, ursächlicher und resultierender Mechanismus, gleichzeitig wirken.

γ/δ -T-Lymphozyten akkumulieren im Bronchialgewebe und finden sich in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Asthmapatienten. Sie können eindringende Pathogene oder geschädigte Zellen direkt, ohne Antigenverarbeitung bzw. ohne Interaktion mit akzessorischen Zellen, erkennen und eine unspezifische zelluläre Immunreaktion einleiten. Sie vermitteln diese immunologische Funktion über die Freisetzung von Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen, wie IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , TNF- α und TGF- β (Kroegel 2002). γ/δ -T-Zellen wird ein protektiver Effekt bei der asthmatischen Atemwegsentszündung zugeschrieben (Kroegel 2002). Dabei scheinen sie die Schwelle der Allergenerkennung zu erhöhen. In Abwesenheit dieser Zellpopulation nimmt die bronchiale Hyperreagibilität zu.

Der in den vorgelegten Ergebnissen beobachtete signifikante Rückgang der γ/δ -T-Lymphozyten im peripheren Blut unter der IFN- α -Therapie wird bisher noch nicht beschrieben. Möglicherweise kommt es unter der Behandlung zu einer vermehrten Transmigration und Akkumulation dieser Zellen ins Lungengewebe mit dem oben beschriebenen protektiven Effekt auf die asthmatische Atemwegsentszündung. Ebenso könnte er aber auch als Zeichen einer verminderten Krankheitsaktivität gewertet werden.

5.5.2 Einfluss auf Regulatorzellen

Die asthmatische Entzündung geht mit einer klonalen CD4⁺-T-Zellproliferation einher (Azzawi et al. 1990, Kroegel 2002, Buettner et al. 2003). Wie in der Literatur beschrieben, zeigte die vorliegende Untersuchung ebenfalls bei den Patienten zu Therapiebeginn eine erhöhte CD4⁺-T-Zellpopulation im Blut. Die alleinige Bestimmung des relativen Anteils von CD4⁺-exprimierenden T-Zellen erlaubt jedoch noch keine Aussage zur immunologischen Wirkung von Interferon- α . So ermöglicht sie nicht zwischen dem Th1- und Th2-Subtyp der CD4⁺-exprimierenden T-Zelle zu unterscheiden. Bei der Bewertung der antiasthmatischen Wirkung von Interferon- α ist der Th1-Subtyp der CD4⁺-T-Helferzellen von besonderem Interesse (Busse und Lemanske 2001). Die in der vorliegenden Studie beobachtete geringe Zunahme des relativen Anteils der CD4⁺-T-Lymphozyten könnte möglicherweise Folge einer Expansion des Th1-Subtyps sein.

Der frühe Aktivierungsmarker CD25 zeigte nur eine geringe Zunahme der Expression auf CD4⁺-T-Zellen unter Interferon- α -Therapie. Bei der CD69-Expression auf

CD4⁺-T-Lymphozyten war dagegen nach 12 Monaten Therapie eine signifikante Abnahme nachzuweisen. Allerdings spricht die sehr geringe Expressionsdichte dieses Oberflächenantigens (0,2 - 0,8 %) nicht dafür, dass die Veränderung dieses Markers unter der Therapie einen Einfluss auf die Pathogenese der asthmatischen Entzündung ausüben kann.

Das Oberflächenantigen HLA-DR wird im Rahmen chronischer Entzündungsvorgänge auf CD4⁺-T-Lymphozyten exprimiert (Kroegel et al. 1995). Unter IFN- α -Therapie kam es bei Patienten mit einer relativen Steroidresistenz zu einer erhöhten HLA-DR-Expression auf den Monozyten des peripheren Blutes. Als Ursache wird das höhere Angebot an IFN- γ vermutet, da die HLA-DR-Expression auf Monozyten durch dieses Zytokin reguliert wird (Schmitz et al. 2001). In der vorliegenden Studie wurde die HLA-DR-Expression auf CD4⁺-T-Lymphozyten gemessen. Dabei war ebenfalls eine Zunahme der Expressionsdichte zu beobachten. Daraus könnte geschlossen werden, dass die gestiegene HLA-DR-Expression auf CD4⁺-T-Lymphozyten des peripheren Blutes ebenfalls auf das erhöhte IFN- γ -Angebot zurückzuführen ist. In einer anderen Studie fand sich eine gesteigerte HLA-DR-Expression auf CD4⁺-T-Zellen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von HCV Patienten. Nach Gabe von Interferon- α war die Zahl von HLA-DR⁺/CD4⁺-T-Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe vermindert, was auf die Wirkung von IFN- α zurückgeführt wurde (Yamaguchi et al. 1997). Diese Ergebnisse stehen scheinbar im Widerspruch zur vorliegenden Arbeit. Die Diskrepanz könnte sich jedoch durch den Charakter der HCV-Infektion erklären lassen, die bei den hier untersuchten Asthmatikern nicht vorlag. Im Gegensatz zum Asthma bronchiale handelt es sich dabei um eine virale, Th1-Zell-dominierte Erkrankung. Hier wirkt körpereigenes IFN- γ über einen anderen Mechanismus (vgl. Abschnitt 5.1). Außerdem basieren die Ergebnisse auf der Expressionbestimmung in der bronchoalveolären Lavage und nicht im peripheren Blut.

Vergleichsweise lange nach Zellaktivierung wird der Kollagenrezeptor VLA-1 (very late antigen) auf CD4⁺-T-Zellen exprimiert. VLA-1 wird als Marker von Memory-T-Zellen beschrieben, die sich bevorzugt in Th1-Zellen differenzieren. Diese Feststellung begründet sich auf der Beobachtung, dass VLA-1⁺/CD4⁺-T-Zellen vermehrt Th1-Zytokine, wie IFN- γ , dagegen nicht Th2-Zytokine, wie IL-4, sezernieren

(Goldstein et al. 2003). Folgt man dieser Auffassung, könnte aus dem hier beobachteten tendenziellen Anstieg der VLA-1-Expression auf CD4⁺-T-Zellen unter Interferon- α -Therapie auf eine vermehrte Differenzierung zu Th1-Zellen geschlossen werden.

Die in der vorgelegten Studie untersuchten Patienten mit Asthma bronchiale Schweregrad IV zeigten zu Therapiebeginn eine erhöhte CD45RO-Expression auf CD4⁺-T-Lymphozyten. Dabei handelt es sich um ein transmembranes Leukozyten-Antigen, welches für die Signaltransduktion der Zelle von Bedeutung ist. Es werden zwei Isoformen unterschieden - naive T-Zellen ohne Antigenkontakt bezeichnet man als CD45RA⁺-Zellen, aktivierte T-Zellen (Memory- oder Gedächtniszellen) als CD45RO⁺-T-Zellen (Kroegel 2002). Bei Asthma bronchiale findet sich eine erhöhte Zahl an aktivierten T-Lymphozyten, die durch eine vermehrte Expression von CD45RO gekennzeichnet sind. CD45RO⁺/CD4⁺-T-Zellen scheinen unter anderem einen stimulierenden Einfluss auf die IgE-Produktion in B-Zellen von Asthmatikern zu haben (Han et al. 1999). Eigene Studien zu anderen chronischen Lungenerkrankungen, wie der idiopathisch pulmonalen Fibrose und der Sarkoidose, zeigten signifikant erhöhte Zellzahlen für CD45RO⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe (Schumann 2003). Daraus kann abgeleitet werden, dass CD45RO einen besonderen Stellenwert bei der Progredienz der Erkrankung einnimmt. Danach kann die gering rückläufige Tendenz der CD45RO-Expression als günstiger Therapieeffekt von Interferon- α gewertet werden.

Über den direkten Zellkontakt oder durch die Sekretion von Zytokinen supprimieren CD8⁺-T-Zellen die Immunantwort anderer T- und B-Lymphozyten. Interferon ist in der Lage, diese Suppressorzellaktivität zu erhöhen (Kroegel 2002). Unter Interferon- α -Therapie war bei den untersuchten Asthmatikern eine Zunahme des relativen Anteils von CD8⁺-T-Lymphozyten zu beobachten. Es lässt sich auf der Grundlage dieser Beobachtung spekulieren, dass die tendenzielle Zunahme dieser T-Zellpopulation auf den Einfluss von Interferon- α zurückgeführt werden kann.

Der Quotient aus CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen kann kleinere numerische Änderungen gelegentlich deutlicher werden lassen. Vor Therapiebeginn betrug der Quotient 4,8 (Referenzbereich 0,6 bis 2,8). Nach 12 Monaten IFN- α -Therapie verringerte er sich

auf 4,5. Obwohl die Relation zwischen $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Lymphozyten weiterhin zugunsten der $CD4^+$ -T-Zellen verlagert ist, könnten die Zunahme des relativen Anteils an $CD8^+$ -T-Lymphozyten als auch die Abnahme des $CD4^+/CD8^+$ -Quotienten für eine verminderte entzündliche Aktivität unter Interferon- α sprechen.

B-Zellen verfügen über eine modulierende Funktion bei der Pathogenese der asthmatischen Inflammation (Kroegel 2002). Die Regulation der IgE-Synthese erfolgt im Zusammenspiel von Makrophagen sowie B- und T-Lymphozyten (Turner und Kinet 1999). Die die Mukosa penetrierenden Allergene werden zunächst von IgM- und IgD-tragenden B-Lymphozyten gebunden. Unter dem Einfluss Th2-assoziiierter Zytokine IL-4, IL-6 und IL-13 differenzieren die allergengebundenen B-Zellen in IgE-bildende Plasmazellen – „*Isotypenumstellung*“ (Kroegel 2002). Das allergenspezifische IgE tritt in das Gewebe über, wo es über den IgE-Rezeptor an Mastzellen bindet und bis zu 12 Wochen nachweisbar bleibt. Durch den Kontakt IgE-besetzter Mastzellen mit Allergenen kommt es zur klassischen IgE-vermittelten Immunreaktion vom Soforttyp mit Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren, wie z. B. Histamin, Tryptase und Leukotrienen, in das umliegende Gewebe (Kroegel et al. 1993). In einem Bericht zur Behandlung des kortikosteroid-resistenten Asthma bronchiale mit IFN- α -Therapie wird eine Vermehrung des relativen B-Zellanteils im peripheren Blut beobachtet (Gratzl et al. 2000). Im Gegensatz dazu ließ sich in der vorliegenden Studie bei sieben von acht untersuchten Patienten ein Rückgang des relativen B-Zellanteils unter IFN- α feststellen. Die Ursache für diese Diskrepanz ist nicht klar.

Aus der Abnahme des relativen B-Zellanteils kann auf eine verminderte IgE-Synthese geschlossen werden. Dieses Ergebnis wird durch die in Tabelle 4.5 dargestellte Veränderung der IgE-Konzentration gestützt. Hier zeigte sich bei fünf von sechs untersuchten Patienten eine Reduktion der IgE-Konzentration im peripheren Blut. Vergleichbare Ergebnisse wurden in In-vitro-Studien an Mäusen, die die inhibierende Wirkung von Typ-I-Interferonen auf die IgE-Produktion nachwiesen (Mujataba et al. 1999), gemacht. Die signifikante Abnahme des relativen B-Zellanteils deutet darauf hin, dass Interferon- α die Th1/Th2-Balance zugunsten der Th1-Zellen beeinflusst (Abb. 5.4). Zur Bestätigung dieser Hypothese sollte allerdings in weiteren

Untersuchungen eine Veränderung von IL-13 unter Interferon- α -Therapie evaluiert werden, da dieses Zytokin neben IL-4 an der IgE-Synthese beteiligt ist.

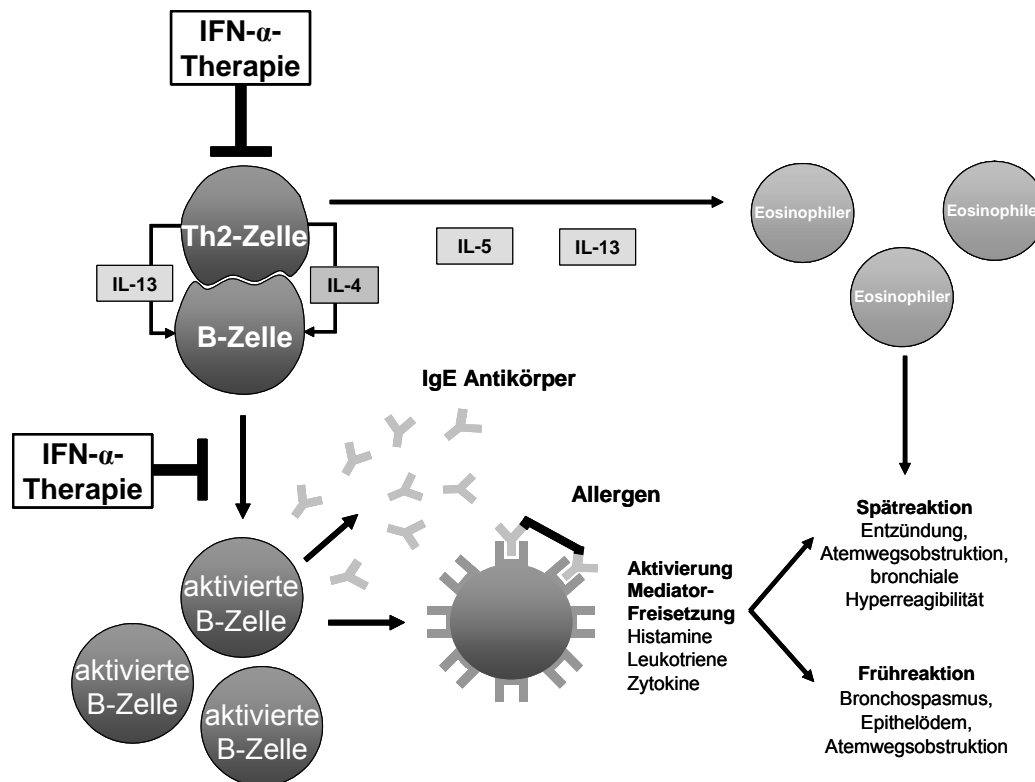


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung des möglichen Effektes der Interferon- α -Therapie auf die Veränderung des relativen B-Zellanteils sowie der IgE-Synthese. Modifiziert nach Busse und Lemanske 2001.

5.5.3 Einfluss der Interferon- α -Therapie auf die Th1/Th2-Balance bei schwergradig persistierendem Asthma bronchiale

5.5.3.1 Th1-Zytokinexpression unter Interferon- α -Therapie

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung, ob und inwieweit Interferon- α in der Lage ist, durch eine gezielte Modulation des Immunsystems die Th1/Th2-Imbalance zugunsten der Th1-Zellen zu beeinflussen. Um diesen möglichen Effekt von Interferon- α sichtbar zu machen, wurde die intrazelluläre Zytokinexpression von CD4⁺-T-Lymphozyten ermittelt. Zur Identifizierung von Th1-Zellen wurden Interleukin-2, Interferon- γ und TNF- α gewählt.

Die hier vorgelegte Untersuchung zeigt eine statistisch signifikante Zunahme der Expressionsdichte von Interleukin-2. IL-2 ist an der Differenzierung und Expression definierter Zytokine in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen beteiligt und unterstützt die Reifung von CD8⁺-T-Lymphozyten (Busse und Lemanske 2001). Gemeinsam mit IL-4 und IL-6 verstärkt es die T-Zell-Proliferation, die Vermehrung der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und das B-Zell-Wachstum (Janeway und Travers 1995, Abbas et al. 1996). Weiterhin hält dieses Zytokin, vermutlich mittels Modifikation von Adhäsionsmolekülen, aktivierte inflammatorische Zellen im Gewebe zurück (Yi-Qing et al. 1995) und ist somit an den Entzündungsvorgängen direkt beteiligt. Bisher ist nur wenig über den Stellenwert von IL-2 beim Asthma bronchiale bekannt. Die in der vorliegenden Untersuchung statistisch signifikante Zunahme der Expressionsdichte von Interleukin-2 lässt auf einen erhöhten Anteil von Th1-Zellen im peripheren Blut schließen. Dieses Resultat lässt sich mit dem Th1/Th2-Paradigma in Einklang bringen und legt nahe, dass die Therapie mit Interferon- α zur Expansion der Lymphozyten vom Th1-Typ führt.

Vergleichbar dem IL-2 kam es bei den Patienten unter IFN- α -Therapie auch zu einer Steigerung der Expression von intrazellulärem Interferon- γ . Dies ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin der klassischen Th1-Zellantwort im Rahmen viraler und bakterieller Infektionen. Außerdem antagonisiert IFN- γ die Wirkungen von IL-4 bei der asthmatischen Entzündungsreaktion (Frew 1998). Dabei bewirkt das Th1-Zytokin durch seine beiden heterodimeren Rezeptoren, IFN- γ -Rezeptor 1 und IFN- γ -Rezeptor 2, die Induktion und Proliferation von Th1-Zellen sowie die Suppression der Th2-Zellantwort und der IgE-Synthese (Wang et al. 2000, Busse und Lemanske 2001, Joos et al. 2004). In In-vivo-Modellen wurde der vorbeugende Effekt von IFN- γ bei der Entwicklung von allergeninduzierter Atemwegseosinophilie und bronchialer Hyperreagibilität gezeigt. Bei mit Ovalbumin sensibilisierten Mäusen war nach der Behandlung mit inhalativem IFN- γ eine verringerte bronchiale Hyperreagibilität sowie IgE-Produktion zu verzeichnen (Lack et al. 1996). IFN- γ -Rezeptor-knock-out-Mäuse entwickelten eine verlängerte antigeninduzierte Atemwegseosinophilie nach Allergenexposition (Coyle et al. 1996). Zwischen dem Schweregrad des Asthma bronchiale und der IFN- γ -Konzentration im peripheren Blut wurde eine inverse Korrelation gefunden (Leonard et al. 1997). Andere Untersuchungen postulieren eine mangelnde IFN- γ -Freisetzung als ein

Hauptmerkmal atopischer Erkrankungen (Nurse et al. 1997). Sie führen Asthma bronchiale auf einen Defekt der IFN- γ -Freisetzung zurück. So wird bei der Entwicklung des atopischen Asthma bronchiale von einem IFN- γ -Mangel ausgegangen (Joos et al. 2004). Anders ausgedrückt wird mittels der IFN- α -Therapie dieser relative Mangel ausgeglichen und damit die Balance wieder hergestellt.

Bei der Behandlung von Patienten mit steroidresistentem Asthma bronchiale mit Interferon- α konnte eine Zunahme der IFN- γ -Konzentration im peripheren Blut beobachtet werden (Seelbach et al. 1999). Auch in der vorliegenden Studie war eine signifikante Erhöhung der IFN- γ -Expression in CD4⁺-T-Zellen nach 12-monatiger Therapie zu verzeichnen. Da IFN- γ als natürlicher Antagonist des proallergisch wirkenden IL-4 im Rahmen des Asthma bronchiale agiert, steht dieses Resultat in Übereinstimmung mit dem therapeutischen Ziel des Einsatzes von Interferon- α . Durch die signifikante Expressionserhöhung eines zweiten relevanten Th1-Zytokins wird die Hypothese, dass Interferon- α zu einer verstärkten Proliferation der Th1-Zellen führt, weiter untermauert.

Auch wenn in neueren Studien Chitosan IFN- γ -pDNA Nanopartikeln im Tiermodell eine signifikante Reduktion der allergeninduzierten Atemwegsentszündung und bronchialen Hyperreagibilität bewirken (Kumar et al. 2003), konnten diese Effekte von IFN- γ am humanen Modell bisher nicht nachgewiesen werden (Frew 1998). Die Inhalation sowie die subkutane Gabe von IFN- γ bei Patienten mit steroidabhängigen Asthma bronchiale zeigten keinen Einfluss auf die FEV₁-Werte und die Symptommhäufigkeit (Kips et al. 2001, Tournoy et al. 2001). In diesem Zusammenhang muss die Wirkung von IFN- γ auf das Überleben des eosinophilen Granulozyten sowie auf die Expression bestimmter Aktivierungsmarker und des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1) auf deren Zelloberfläche beachtet werden (Busse und Lemanske 2001, Lopez et al. 2003). Hiernach führt IFN- γ gemeinsam mit TNF- α zu einer verstärkten CD69- und CD95-Expression auf Eosinophilen (vgl. Tab. 4.3). Damit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass die Zellen über die Bindung an den CD69- und CD95-Liganden eine Apoptose durchlaufen. Das wiederum könnte die Abnahme der Eosinophilen erklären. Die günstigen klinischen Effekte der Interferon- α -Therapie in der vorliegenden Studie

lassen vermuten, dass über die subkutane Gabe von IFN- α noch weitere, das Entzündungsgeschehen limitierende Mechanismen ausgelöst werden.

Der Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α wird in asthmatischen Atemwegen exprimiert und spielt möglicherweise eine besondere Rolle im Remodelling der Atemwege (Schwinghackl et al. 1999, Kroegel 2001). Es wird von Th1-Zellen und Makrophagen produziert und weist synergistische Effekte mit IFN- γ auf (Lopez et al. 2003). TNF- α verfügt über proinflammatorische Effekte, wie die Leukozytenrekrutierung im Gewebe durch eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen sowie die Induktion der Zytokin- und Chemokinsynthese (Hirata et al. 1998). In der BAL-Flüssigkeit und in Biopsien von Asthmatikern wurden nach segmentaler Provokation erhöhte TNF- α Konzentrationen gefunden (Virchow 1995, Keatings 1996). Da TNF- α vorrangig von Th1-Zellen sezerniert wird, könnte der nicht signifikante Anstieg TNF- α -Expression in CD4⁺-T-Lymphozyten unter IFN- α -Therapie als Zeichen der vermehrten Th1-Zelldifferenzierung zu werten sein.

5.5.3.2 Th2-Zytokinexpression unter Interferon- α -Therapie

Asthma bronchiale ist eine Th2-Zell-dominierte Erkrankung. Th2-Lymphozyten setzen ein definiertes Spektrum von Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) frei. Interferone fördern die Differenzierung von Th0-Zellen zu Th1-Zellen und verschieben auf diese Weise bei allergischen Erkrankungen das Gleichgewicht vom dominierenden Th2- zum Th1-Phänotyp (Kroegel 2002). Um diesen möglichen Effekt von Interferon- α sichtbar zu machen, wurden neben der Expression der Th1-assoziierten Zytokine relevante Th2-Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-10) erfasst.

Interleukin-4 zählt zu den Th2-Zell-assoziierten Zytokinen (Kips und Tournoy 2001, Kroegel 2001, Yssel et al. 2001), dem nach zahlreichen Untersuchungen eine zentrale Rolle bei der Organisation der asthmatischen Entzündung zugeschrieben wird (Kroegel 2002). Ferner gilt es neben Interleukin-13 als stärkster Gegenspieler von IFN- γ im Th1/Th2-Paradigma (Kips et al. 2001, Kroegel 2001). IL-4 aktiviert Makrophagen, stimuliert die B-Lymphozyten- und Mastzellproliferation (Kroegel 2002, Doshi et al. 2002), induziert die IgE-Produktion sowie den IgG-IgE-Klassenswitch in B-Zellen (Nolte 1995, Zhou et al. 1997, Wang et al. 2000, Gemou-Engesaeth et al. 2002). Beim Asthma bronchiale findet man erhöhte Konzentrationen von IL-4 in der bronchoalveolären Lavage (Walker et al. 1992, Kroegel et al. 1996)

als auch erhöhte IL-4-mRNA-Expressionswerte im peripheren Blut (Magnan et al. 2000, Gemou-Engesaeth et al. 2002, Shirai et al. 2003). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden IL-4-Antikörper und lösliche IL-4-Rezeptoren als anti-asthmatische Strategie entwickelt. Diese können im murinen Modell allergeninduzierte bronchiale Hyperreagibilität und pulmonale Eosinophilie hemmen (Doshi et al. 2002). Allerdings bleiben die klinischen Effekte beim Einsatz von inhalativen IL-4-Antikörpern bei Patienten mit Asthma bronchiale unter den an sie gerichteten Erwartungen (Kroegel 2002, Ziesche und Block 2002).

Aus dem theoretischen Ansatz der immunmodulatorischen Wirkung von Interferon- α ist eine verminderte Expression von IL-4 in CD4⁺-T-Lymphozyten unter der IFN- α -Therapie zu erwarten. Eine solch inhibierende Wirkung von Interferon- α konnte in dieser Studie allerdings nicht beobachtet werden. Vielmehr kam es unter der Behandlung mit IFN- α zu einem, wenn auch nicht signifikanten Anstieg der IL-4-Protein-Expression in CD4⁺-T-Zellen. Dieser Diskrepanz könnten unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen. So gibt es kontroverse Auffassungen zum Stellenwert von IL-4 beim chronisch inflammatorischen Geschehen. In einer Untersuchung konnten keine Unterschiede bei der IL-4-mRNA-Expression in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen des peripheren Blutes von Asthma bronchiale Patienten und Nichtasthmatikern nachgewiesen werden (Grob et al. 2003). In einem anderen Fall wurde eine unveränderte IL-4-Expressionsintensität vor und nach segmentaler Provokation beobachtet (Krug et al. 2001). Eine verminderte IL-4-Expression in CD4⁺-T-Lymphozyten war während einer Asthmaexazerbation zu verzeichnen (Kuo et al. 2001). In einer weiteren Studie kam es unter Interferontherapie zu einer Erhöhung der IL-4-Konzentration im peripheren Blut (Brod 2002). Einzelne Autoren sprechen IL-4 sogar ein antiinflammatorisches Potenzial zu.

Systemische Glukokortikoide inhibieren die Expression von verschiedenen Zytokinen, wie auch Interleukin-4 (Oehling et al. 1997, Crocker et al. 1998). Unter der Therapie mit inhalativen Glukokortikoiden konnte der prozentuale Anteil IL-4-exprimierender CD4⁺-T-Zellen signifikant reduziert werden (Gemou-Engesaeth et al. 2002). Für die vorliegende Studie kann nicht ausgeschlossen werden, dass die signifikante Reduktion der systemischen Glukokortikoiddosis der Patienten einen wesentlichen Faktor für die gestiegenen IL-4-Expression darstellt. Unter diesem

Aspekt steht dieses Resultat nicht im Widerspruch zu einer möglichen Th1/Th2-Beeinflussung zugunsten der Th1-Zelle unter der Interferon- α -Behandlung.

Obwohl IL-4 eine wichtige initiale Rolle bei der Th2-Zellentwicklung zukommt, ist es offensichtlich nicht in der Lage, alle allergeninduzierten Atemwegsveränderungen zu verursachen (MacKenzie et al. 2001). Hierfür sind weitere kostimulierende Faktoren erforderlich (Kroegel 2002). In diesem Zusammenhang stehen Studien zu den Interaktionen von IL-13 mit IL-4 (Williams 2004). Wie in der Zwischenzeit bekannt ist, existieren immunologische Redundanzmechanismen. So kann z. B. IL-13 zu einer Aktivierung des IL-4-Rezeptors führen (Kips et al. 2001, Kroegel 2002), so dass die Ausschaltung eines Zytokins nicht ausreicht, um Transduktionswege zu unterbinden. Zum besseren Verständnis der pathogenetischen Mechanismen bedarf es weiterführender Untersuchungen dieser Interaktionen.

Interleukin-5 kommt, ebenso wie IL-4, eine Schlüsselrolle bei der Produktion, Differenzierung, Reifung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten zu (Tavernier et al. 1996, Kips et al. 2001, Kay et al. 2004). Es wird von Th2-Lymphozyten produziert. Dieses Zytokin erleichtert die Eosinophilenrekrutierung im Gewebe und verlängert das Überleben der eosinophilen Granulozyten (Williams 2004). So führt die Inhalation von IL-5 zu einer Erhöhung des prozentualen Eosinophilenanteils im Sputum sowie zu einer Verlängerung der bronchialen Hyperreagibilität bei Asthmatikern (Shi et al. 1998). Außerdem lassen sich signifikant erhöhte Expressionswerte sowohl der IL-5-mRNA als auch der IL-5-Proteinkonzentrationen in der Atemwegsmukosa von Asthma bronchiale Patienten nachweisen (Hamid et al. 1991, Robinson et al. 1993, Borger et al. 1999). Dabei wurde eine signifikant inverse Korrelation mit dem FEV₁-Wert der Asthmatiker gefunden (Borger et al. 1999). Corrigan und Mitarbeiter zeigten 1995, dass ein Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil der IL-5-mRNA-exprimierenden CD4⁺-T-Zellen und der Schwere der asthmatischen Erkrankung sowie der Zahl der Bluteosinophilen besteht. Für Interferon- α wird eine inhibierende Wirkung auf die IL-5-Produktion durch CD4⁺-T-Zellen beschrieben (Schandene et al. 1996, Seelbach et al. 2000). Eine reduzierte IL-5-Protein-Expression unter IFN- α -Therapie hätte die hypothetische Annahme einer Verschiebung der Th1/Th2-Balance zugunsten der Th1-Zellen durch Interferon- α gestützt. Im Gegensatz dazu erhöhte sich in der Studie

unter Therapie die IL-5-Expressionsintensität nicht signifikant. Da für orale und inhalative Glukokortikoide ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf die IL-5-Expression von CD4⁺-T-Zellen beschrieben wird (Mori et al. 1995, Gemou-Enggesaeth et al. 2002), kann auch hier, wie schon bei IL-4 beschrieben, die signifikante Reduktion der oralen Glukokortikoiddosis als Ursache für die Erhöhung der IL-5-Protein-Expression unter IFN- α -Therapie nicht ausgeschlossen werden.

Das Resultat der vorliegenden Studie zeigt Übereinstimmung mit Publikationen, nach denen die IL-5-Expression nicht direkt mit dem klinischen Erscheinungsbild des Asthma bronchiale korreliert. So konnte durch den Einsatz von monoklonalen IL-5-Antikörpern (Mepolizumab) eine signifikante und lang anhaltende Senkung der Blut- und Sputumeosinophilie, aber keine markanten Effekte bei der Lungenfunktion von Asthmatikern verzeichnet werden (Leckie et al. 2000). Die Behandlung mit Mepolizumab führte zu einer deutlichen, schnellen und anhaltenden Reduktion der Eosinophilenzahl und einer Verminderung des Serum-ECP-Spiegels, aber keiner Suppression der Th2-Zellaktivität (Buettner et al. 2003). Bei einem Test des monoklonalen IL-5-Antikörpers SCH55700 an Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale war keine Besserung der FEV₁ zu beobachten (Kips et al. 2003). Demgegenüber kam es in der vorliegenden Studie unter der Therapie mit IFN- α , trotz leicht erhöhter IL-5-Expression, zu einer raschen Besserung der Asthmasymptomatik. Das gute klinische Erscheinungsbild konnte bei den Patienten auch nach 12 Monaten Therapie nachgewiesen werden.

Die durch IL-5 induzierte Eosinophilie in den Atemwegen hat einen entscheidenden Einfluss auf das Atemwegsremodelling und damit auf die Chronifizierung und Prognose der Erkrankung (Shardonofsky 1999, Kroegel 2000, Kips et al. 2001, Kay et al. 2004, Williams 2004). Auch wenn sich eine gezielte Reduktion dieses Mediators nicht unmittelbar auf die Klinik des Asthma bronchiale auswirkt, dürfen die langfristigen negativen Effekte einer erhöhten IL-5-Expression nicht vernachlässigt werden. Hier könnte die Kombination von IFN- α mit anti-IL-5-Antikörpern einen interessanten Therapieansatz bilden.

Die Bedeutung des IL-10 im Rahmen der asthmatischen Entzündung und selbst die Zuordnung dieses Interleukins zu den Th2-Zytokinen werden kontrovers diskutiert.

Im peripheren Blut (Joos et al. 2004) sowie nach segmentaler Provokation in der bronchoalveolären Lavage wurde bei Patienten mit Asthma bronchiale eine erhöhte IL-10-Expression eruiert (Colavita et al. 2000, Wong et al. 2001). In der vorliegenden Studie konnte eine geringe Expressionsabnahme unter IFN- α -Therapie gemessen werden. Diese Beobachtung könnte mit der Hypothese der Beeinflussung der Th1/Th2-Balance zugunsten der Th1-Zelle erklärt werden.

Demgegenüber sprechen andere Studien für eine Neubewertung des IL-10 im asthmatischen Geschehen. Hier wird IL-10 als ein antiinflammatorisches und immunregulatorisches Zytokin mit hohem therapeutischem Potenzial für die Asthmabehandlung gesehen (Umetsu und DeKryuff 1999, Tournoy et al. 2001). IL-10 inhibiert die IL-5- und Chemokinsynthese, induziert eine Th2-Zell-Toleranz und blockiert eine Reihe bestimmter Funktionen von Eosinophilen und Mastzellen (Akdis 1998, Adachi 1999). Neben der Prävention der Atemwegseosinophilie durch IL-10 kommt es zu einer verminderten Produktion von IL-4, IL-5 und TNF- α in den Lungen von Patienten mit Asthma bronchiale (Umetsu und DeKryuff 1999). Glukokortikoide führten zu einer Erhöhung der IL-10-Produktion (Hodge et al. 1999). So wurde neben der deutlichen Besserung der klinischen Symptome bei der IFN- α -Therapie von Patienten mit steroidresistentem Asthma bronchiale auch eine Induktion der IL-10-Expression gemessen (Simon et al. 2003). Auch in der vorliegenden Studie müssen mögliche Interaktionen zwischen der IL-10-Expression und der signifikanten Reduktion der Glukokortikoiddosis berücksichtigt werden.

5.6 Hypothetischer Wirkmechanismus und therapeutische Bedeutung von Interferon- α bei der Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale

Die signifikante Expressionserhöhung der Th1-assoziierten Zytokine IL-2, IFN- γ und die Expressionserhöhung von TNF- α berechtigen zu der Schlussfolgerung, dass IFN- α eine verstärkte Differenzierung der Th0-Zelle zur Th1-Zelle bewirkt. Im Verlauf der Studie wurden jedoch ebenso, wenn auch nicht signifikant, erhöhte Zytokinsignalstärken der Th2-assoziierten Zytokine IL-4 und IL-5 ermittelt. Aus Sicht der Beeinflussung der Th1/Th2-Imbalance ist dieses Ergebnis nicht unmittelbar zu erklären. Allerdings könnte einerseits die Reduktion der systemischen

Glukokortikoide, aber auch ein negativer Rückkopplungsmechanismus als Folge der erhöhten Th1-Zytokinexpression hiermit im Zusammenhang stehen.

Die Beeinflussung der Th1/Th2-Imbalance durch Interferon- α ist mit der signifikanten Abnahme des relativen B-Zellanteils sowie der Verminderung des Gesamt-IgE unter Therapie vereinbar. Interferone vom Typ 1 sind in der Lage, die B-Zellproliferation sowie die IgE-Produktion zu hemmen. Danach scheint es bei der Behandlung von Patienten mit schwergradig persistierendem Asthma bronchiale, eine direkt inhibierende Wirkung von IFN- α oder einen indirekten Einfluss über die Expressionserhöhung von IFN- γ auf die B-Zellproliferation zu geben. Folge dieses Effekts wäre eine Verminderung der asthmatischen Frühreaktion. Die Reduktion der Anzahl eosinophiler Granulozyten könnte auf eine reduzierte Th2-Zellaktivität und einer damit verbundenen reduzierten Produktion eosinophilen-aktivierender Mediatoren zurückgeführt werden. Eine zweite Erklärung für die Abnahme der Eosinophilenzahl könnte mit einer erhöhten Apoptoseneigung im Zusammenhang stehen. Wie die vorgelegte Untersuchung zeigt, kommt es unter Interferon- α auch zu einer Erhöhung des apoptose-vermittelnden Rezeptors CD69 auf eosinophilen Granulozyten.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und publizierten Daten lässt sich ein Modell des möglichen Wirkmechanismus von Interferon- α im Rahmen des Asthma bronchiale gemäß Abbildung 5.5 ableiten. Die an der asthmatischen Inflammation beteiligten Zytokine sind in eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen involviert und bewirken zum Teil gegenläufige Prozesse (Doshi et al. 2002). Bei der modellhaften Darstellung in Abbildung 5.5 werden mögliche Angriffspunkte von Interferon- α aufgezeigt. Allerdings dürften die dem Asthma bronchiale zugrunde liegenden pathogenetischen Mechanismen wesentlich komplexerer Natur sein. Inwieweit die evaluierten Veränderungen der untersuchten Zellpopulationen und Zytokinexpressionen quantitativ, qualitativ und im temporalen Bezug den tatsächlichen Abläufen entsprechen, muss deshalb durch zukünftige Studien geklärt werden.

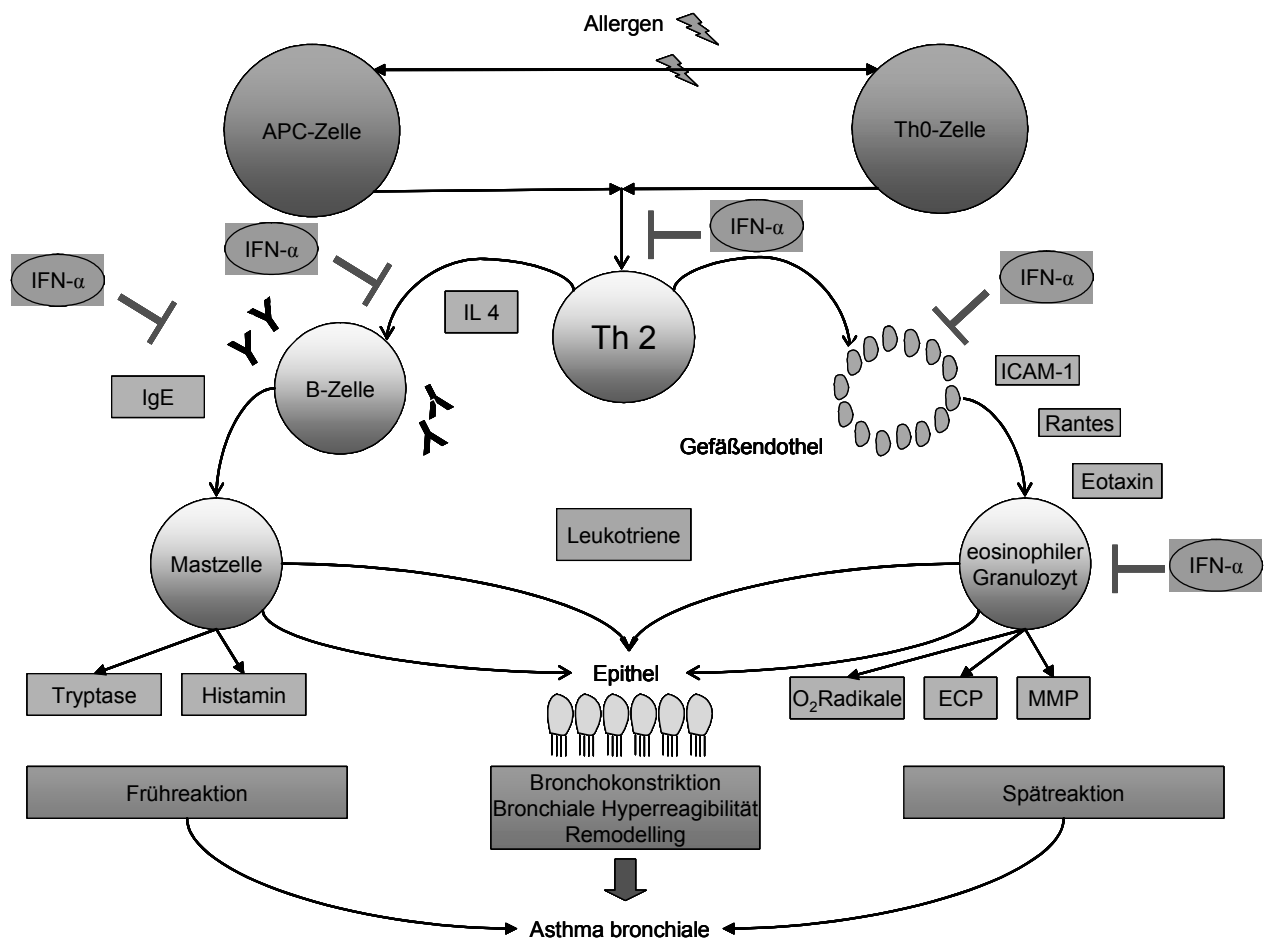


Abbildung 5.5: Schematische Darstellung der dem Asthma bronchiale zugrunde liegenden pathogenetischen Prozesse und möglichen Interaktionen von Interferon- α . Modifiziert nach Kroegel 2001.

Die Ergebnisse der Arbeit unterstützen die in den letzten Jahren etablierte Betrachtungsweise, dass Asthma bronchiale eine Th2-Zell-dominierte Erkrankung ist. Interferon- α kann im Rahmen der asthmatischen Entzündung spezifische immunologische Interaktionen modifizieren, die eine Gleichgewichtsverschiebung zum Th1-Subtyp begünstigen (Abb. 5.6). Die Resultate der vorliegenden Studie belegen, dass die Behandlung mit Interferon- α zu einer überzeugenden Besserung der Krankheitssymptome und der Lungenfunktion, zu einer Einsparung von systemischen Glukokortikoiden und inhalativen β_2 -Mimetika sowie zu einem Zugewinn an Lebensqualität führen. Danach handelt es sich bei der Therapie mit Interferon- α um eine wirkungsvolle Behandlungsalternative für Patienten mit

schwergradig persistierendem Asthma bronchiale. Die in dieser Arbeit dokumentierten Modifikationen auf zellulärer Ebene können die sehr guten klinischen Effekte der Interferon- α -Therapie noch nicht hinreichend erklären. Hierfür bedarf es weitergehender Untersuchungen.

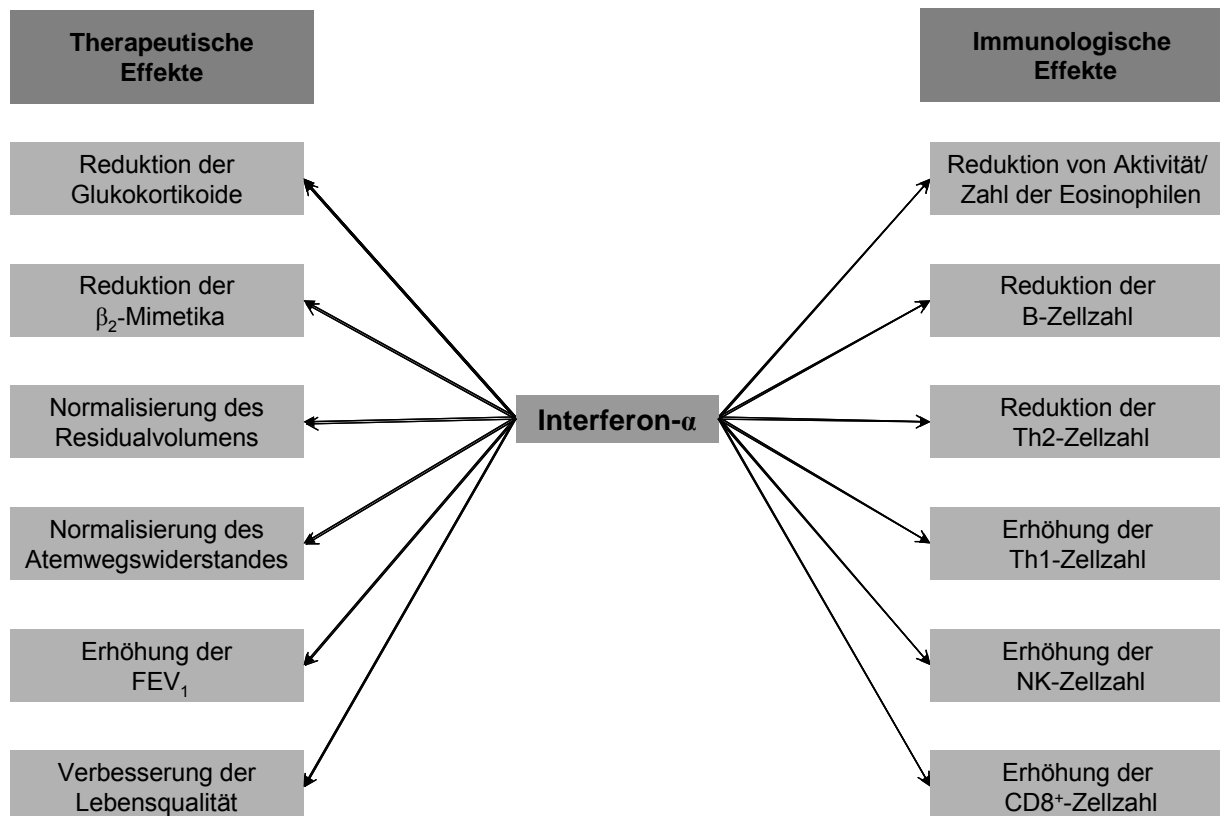


Abbildung 5.6: Asthma-relevante therapeutische und immunologische Effekte von IFN- α .

5.7 Limitationen der Untersuchung

Bei allen, in dieser Studie untersuchten Patienten, handelt es sich um weibliche Patienten. Das weibliche Geschlecht ist häufiger von Asthma bronchiale betroffen, beim schwergradig persistierenden Asthma bronchiale beträgt das Verhältnis sogar 9 : 1. Im Oktober 2003 führt eine Studie des National Jewish Medical and Research Center Denver zu dem Ergebnis, dass 68 % der erwachsenen Asthma-Patienten Frauen sind (Jenkins et al. 2003). Unter diesem Aspekt kann das deutliche

Überwiegen des weiblichen Geschlechts in der untersuchten Patientengruppe vertreten werden.

Ein weiterer Faktor bei der Bewertung der Resultate der vorliegenden Studie ist die geringe Anzahl der Patienten. Diese Limitation ist auch in der fehlenden Übernahme der Behandlungskosten durch die Krankenkassen begründet. Aufgrund der geringen Patientenzahl kommen individuelle Unterschiede stärker zum Tragen und erschweren die Interpretation der Ergebnisse.

Asthma bronchiale ist eine Anfallserkrankung. Im Rahmen der Datenerhebung war es nicht zu umgehen, dass Patienten zu den festgelegten Messzeitpunkten einen pulmonalen Infekt aufwiesen. Die Patienten KM, SK und SE hatten zum Messzeitpunkt 12 Monate einen bronchopulmonalen Infekt, was zu einer Beeinflussung der Messergebnisse, sowohl bei der Bestimmung der Lungenfunktion als auch bei Ermittlung immunologischer Parameter, geführt haben kann. Dieser Einfluss von Infekten auf Studienergebnisse kann nur über die Erfassung größerer Patientenzahlen verringert werden.

Alle Patienten wurden über viele Jahre (≥ 5 Jahre) hochdosiert mit Steroiden therapiert. Durch die signifikante Reduktion systemischer Glukokortikoide unter IFN- α -Behandlung muss auch von einem Ausbleiben deren anerkannter anti-inflammatorischen Wirkung im Rahmen des Asthma bronchiale ausgegangen werden. So war es in der vorliegenden Studie nicht möglich, ausschließlich die Wirkung von Interferon- α hinsichtlich therapeutischer und immunologischer Effekte zu untersuchen.

Um Schwankungen in den Messwerten durch zirkadiane Sekretionsrhythmen zu minimieren, fanden die erforderlichen Blutentnahmen immer im Verlauf des Vormittags statt. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass z. B. periodische Schwankungen die ermittelten Signalstärken der untersuchten Mediatoren beeinflusst haben. Andererseits ist prinzipiell davon auszugehen, dass zwischen den einzelnen Patienten individuelle Unterschiede bezüglich immunologischer Parameter bestehen. Diese sind abhängig von Alter, Geschlecht, Begleiterkrankungen und bestehendem Infekt.

5.8 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass Interferon- α als immunmodulatorischer Ansatz zur Korrektur der unerwünschten Th2-Dominanz im Rahmen des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale dienen könnte. Aufgrund der Komplexizität der pathogenetischen Prozesse beim Asthma bronchiale kann die Arbeit nur hypothetische Angriffspunkte von Interferon- α herausarbeiten. Zum weiteren Verständnis wären weiterführende Untersuchungen auch anderer Entzündungsmediatoren, wie IL-6 und IL-13, unter der Therapie mit IFN- α von großem Nutzen.

Die im Rahmen der Studie gezeigten überzeugenden therapeutischen Effekte von IFN- α sprechen für den verstärkten Einsatz dieses Präparates bei der Behandlung von Patienten mit Asthma bronchiale vom Schweregrad IV. Mit Interferon- α steht für die Therapie des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale ein wirksames Medikament mit einem geringeren, besser kontrollierbaren und reversiblen Nebenwirkungsprofil zur Verfügung.

Neue Applikationsformen, wie das pegylierte Interferon- α -2b (Pegasys[®] oder PEG-Intron[®]), erhöhen die Effektivität des Präparates und verbessern die Compliance der Patienten. Durch die Bindung des Interferon-Moleküls an Polyethylenglykol, was als inertes Trägermolekül fungiert, ist die Eliminationshalbwertszeit durch eine reduzierte Clearance deutlich verlängert. So liegt diese bei pegyliertem Interferon bei 40 Stunden, die des konventionellen Interferon- α bei 4 Stunden. Pegyliertes Interferon erlaubt eine Abnahme der Applikationsfrequenz und hat somit eine deutlich geringere Nebenwirkungsrate. Zudem ist die Antigenität vermutlich vermindert, was ein geringeres Risiko der Entwicklung von Autoimmunreaktionen zur Folge hat.

Andere antientzündliche Therapieansätze, wie monoklonale Anti-IL-5-Antikörper und Anti-CD69-Antikörper, sollten hinsichtlich ihrer Kombinationsmöglichkeit mit IFN- α bei der Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale geprüft werden. Hier können synergistische Effekte vermutet werden, die sich insbesondere auf die Chronifizierung und Progredienz der Erkrankung positiv auswirken. Von besonderem Interesse wird der Vergleich der IFN- α -Therapie mit dem monoklonalen IgE-Antikörper Omalizumab (Xolair[®]), der noch in diesem Jahr zur Behandlung des

schwergradig persistierenden Asthma bronchiale zugelassen werden wird. Hierbei ist auch die Frage nach der Kombination beider Medikamente potentiell von Interesse. Da die Substanzen jeweils unterschiedliche Ansatzpunkte aufweisen, ist auch eine synergistische Wirkung nicht auszuschliessen.

Die Resultate der vorliegenden Studie machen deutlich, dass alle Patienten unter der Therapie mit Interferon- α eine signifikante Erhöhung der Lebensqualität erfahren haben. Allein diese Tatsache sollte ausreichend sein, den hier aufgezeigten therapeutischen Ansatz in weiteren klinischen Studien fortzuführen und Interferon- α als Therapieoption bei der Behandlung des schwergradig persistierenden Asthma bronchiale zu etablieren.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Lichtmann AH und Pober JS. 1996. Immunologie. Bern, Göttingen, Toronto, Seattle: Verlag Hans Huber.
- Adachi T, Stafford S, Sur S and Alam R. 1999. A novel lyn-binding peptide inhibitor blocks eosinophil differentiation, survival, and airway eosinophilic inflammation. *J Immunol*, 163: 939-946.
- Aldebert D, Lamkhioed B, Dessaint C, Gounni AS, Goldman M, Capron A, Prin L and Capron M. 1996. Eosinophils Express a Functional Receptor for Interferon α : Inhibitory Role of Interferon α on the Release of Mediators. *Blood*, 87: 2354-2360.
- Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wüthrich B and Blaser K. 1998. Role of interleukin 10 in allergen-specific immunotherapy. *J Clin Invest*, 102: 1-9.
- Antoniou K, Ferdoutsis E and Bouros D. 2003. Interferons and their application in the diseases of the lung. *Chest*, 123: 209-216.
- Azzawi M, Bradley B, Jeffrey PK et al. 1990. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis*, 142: 1407-1413.
- Barnes PJ. 2000. Endogenous inhibitory mechanismus in asthma. *Am J Resp Crit Care Med*, 161: 176-181.
- Beeh KM and Buhl R. 2001. Asthma Pathogenesis – Implications for novel therapies. *Med Klin*, 96: 15-25.
- Bini EJ and Weinshel EH. 1999. Severe exacerbationen of asthma: a new side effect of interferon- α in patients with asthma and chronic hepatitis C. *Mayo Clin Proc*, 74: 367-370.
- Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E and Dubs RW. 2004. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *EurJ Haematol*, 72: 203-212.
- Boguniewicz M, Martin RJ, Martin D, Gibson U and Celniker A. 1995. The effects of nebulized recombinant interferon γ in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol*, 95: 133-135.
- Borger P, Ten Hacken NH, Vellenga E, Kauffman HF and Postma DS. 1999. Peripheral blood T lymphocytes from asthmatic patients are primed for enhanced expression of interleukin (IL)-4 and IL-5 mRNA: associations with lung function and serum IgE. *Clin Exp Allergy*, 29: 772-779.
- Bousquet J, Jeffrey PK and Busse WW. 2000. Asthma – from bronchokonstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*, 161: 1720-1745.
- Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, Barneon G, Ghavanian N, Enander I, Venge P, Ahlstedt S, Simony-Lafontaine J and Godard P. 1990. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med*, 323: 1033-1039.

- Braun RK, Foerster M, Grahmann PR, Haefner D, Workalemahu G and Kroegel C. 2003. Phenotypic and molecular characterization of CD103⁺ CD4⁺ T cells in bronchoalveolar lavage from patients with interstitial lung diseases. *Cytometry B Clin Cytom*, 54: 19-27.
- Brod SA. 2002. Ingested Type I Interferon: A potential treatment for autoimmunity. *J Interferon Cytokine Res*, 22: 1153-1166.
- Busch FW, Schmidt H and Steinke B. 1991. α interferon for the hypereosinophilic syndrome. *Ann Intern Med*, 114: 338-339.
- Busse WW and Lemanske RF. 2001. Asthma. *N Engl J Med*, 344: 350-361.
- Buettner C, Lun A, Splettstoesser G, Kunkel G and Renz H. 2003. Monoclonal anti-interleukin-5 treatment suppresses eosinophil but not T-cell functions. *Eur Respir J*, 21: 799-803.
- Butterfield JH and Gleich GJ. 1994. Interferon- α treatment of six patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Ann Intern Med*, 121: 648-653.
- Choy EHS and Panayi GS. 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis (Review). *N Engl J Med*, 344: 907-916.
- Colavita AM, Hastie AT and Musani AI. 2000. Kinetics of IL-10 production after segmental allergen challenge of atopic asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 106: 880-886.
- Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, Tsai JJ, Frew AJ and Kay AB. 1991. Glucocorticoid resistance in chronic asthma: glucocorticoid pharmacokinetics, glucocorticoid receptor characteristics, and inhibition of peripheral blood T cell proliferation by glucocorticoids in vitro. *Am Rev Respir Dis*, 144: 1016-1025.
- Corrigan CJ, Hamid Q, North J, Barkans J, Moqbel R, Durham S, Gemou-Engesaeth V and Kay AB. 1995. Peripheral blood CD4 but not CD8 T-lymphocytes in patients with exacerbation of asthma transcribe and translate messenger RNA encoding cytokines which prolong eosinophil survival in the context of a Th2-type pattern: effect of glucocorticoid therapy. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 12: 567-578.
- Coyle AJ, Tsuyuki S, Bertrand C, Huang S, Aguet M, Alkan SS and Anderson GP. 1996. Mice lacking the IFN- γ receptor have impaired ability to resolve a lung eosinophilic inflammatory response associated with a prolonged capacity of T cells to exhibit a Th2 cytokine profile. *J Immunol*, 156: 2680-2685.
- Crocker IC, Church MK, Newton S and Townley RG. 1998. Glucocorticoids inhibit proliferation and interleukin-4 and interleukin-5 secretion by aeroallergen-specific T-helper type 2 cell lines. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 80: 509-516.
- Dallaire M-J, Ferland C, Lavigne S, Chakir J and Laviolette M. 2002. Migration through basement membrane modulates eosinophil expression of CD44. *Clin Exp Allergy*, 32: 898-905.
- Dauber JH, Gibson KF and Kaminski N. 2004. Interferon- γ 1b in idiopathic pulmonary fibrosis. What we know and what must we learn. *Am J Resp Crit Care Med*, 170: 107-108.
- Davies DE, Wicks J, Powell RM, Puddicombe SM and Holgate ST. 2003. Airway remodelling in asthma: new insights. *J Allergy Clin Immunol*, 111: 215-225.

- DeMaeyer J and DeMaeyer-Guignard J. 1998. Interferons and other regulatory cytokines. New York: John Wiley & Sons.
- Dorscheid DR, Low E, Conforti A, Shifrin S, Sperling AI and White SR. 2003. Corticosteroid-induced apoptosis in mouse airway epithelium: Effect in normal airways and after allergen-induced airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 111: 360-366.
- Doshi U, Salat P and Parikh V. 2002. Cytocine Modulators In Asthma: Clinical Perspectives. *Ind J Pharmacol*, 34: 16-25.
- Duncan CJA, Lawrie A, Blaylock HG, Douglas JG and Walsh GM. 2003. Reduced eosinophil apoptosis in induced sputum correlates with asthma severity. *Eur Respir J*, 22: 484-490.
- Fish JE and Peters SP. 1999. Airway remodelling and persistent airway obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 104: 509-516.
- Foerster M, Haefner D and Kroegel C. 2002. Bcl-2-mediated regulation of CD69-induced apoptosis of human eosinophils: identification and characterization of a novel receptor-induced mechanism and relationship to CD95-transduced signalling. *Scand J Immunol*, 56: 417-428.
- Frew AJ. 1998. T cells in allergy and asthma. *Rev. Esp. Alergol Immunol Clin*, 13: 241-248.
- Gemou-Engesaeth V, Fagerhol MK, Toda M, Hamid Q, Halvorsen S, Groegaard JB and Corrigan CJ. 2002. Expression of activation markers and cytokine mRNA by peripheral blood CD4⁺ and CD8⁺ T cells in atopic and nonatopic childhood asthma: effect of inhaled glucocorticoid therapy. *Pediatrics*, 109: 24-33.
- Gerok W, Huber C und Meinertz T. 2000. Die Innere Medizin. Stuttgart, New York: Schattauer Verlagsgesellschaft mbH.
- Goldstein I, Ben-Horin S, Li J, Bank I, Jiang H and Chess L. 2003. Expression of the $\alpha 1\beta 1$ integrin, VLA-1, marks a distinct subset of human CD4⁺ memory T cells. *J Clin Invest*, 112: 1444-1454.
- Gounni AS, Gregory B, Nutku E, Aris F, Latifa K, Minshall E, North J, Tavernier J, Levit R, Nicolaidis N, Robinson D and Hamid Q. 2000. Interleukin-9 enhances interleukin-5 receptor expression, differentiation, and survival of human eosinophils. *Blood*, 96: 2163-2171.
- Guillevin L, Lhote F, Cohen P, Jarrousse B, Lortholary O, Genereau T, Leon A and Bussel A. 1995. Corticosteroids plus pulse cyclophosphamide and plasma exchanges versus corticosteroids plus pulse cyclophosphamide alone in the treatment of polyarteritis nodosa and churg-strauss syndrome patients with factors predicting poor prognosis. A prospective, randomized trial in sixty-two patients. *Arthritis Rheum*, 38: 1638-1645.
- Gratzl S, Palca A, Schmitz M und Simon H-U. 2000. Interferon- α : Eine erfolgsversprechende Therapiemöglichkeit bei kortikosteroidresistentem Asthma bronchiale. *Allergologie*, 485-491.
- Groenke L, Kannieß F, Holz O, Joerres RA and Magnussen H. 2002. The relationship between airway hyper-responsiveness, markers of inflammation and lung function depends on the duration of the asthmatic disease. *Clin Exp All*, 32: 57-63.

- Grob M, Schmid-Grendelmeier P, Joller-Jemelka HI, Ludwig E, Dubs RW, Grob PJ, Wüthrich B and Bisset LR. 2003. Altered intracellular expression of the chemokines MIP-1 α , MIP-1 β and IL-8 by peripheral blood CD4⁺ and CD8⁺ T cells in mild allergic asthma. *Allergy*, 58: 239-245.
- Haefner D, Foerster M, Hengst U, Reißig A, Mock B, Machnik A, Henzgen M, Grahmann PR, Braun RK und Kroegel C. 2001. Immunmodulatorische Behandlung des schweren Kortikosteroid-abhängigen Asthma bronchiale und des Churg-Strauss-Syndroms mit Interferon. *Klinischer Verlauf. Pneumologie*, 55: 71.
- Hagimoto N, Kuwano K, Miyazaki H, Kunitake R, Fujita M, Kawasaki M, Kaneko Y and Hara N. 1997. Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17: 272-278.
- Hamelmann E and Schleimer R. 2003. Corticosteroid treatment in bronchial asthma: For better or for worse? *J Allergy Clin Immunol*, 111: 248-250.
- Hamid Q, Azzawi N, Ying S et al. 1991. Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J Clin Invest*, 87: 1541-1546.
- Han S, Huang J and An D. 1999. The effect of memory T lymphocytes on IgE production by B lymphocytes in patients with bronchial asthma. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 38: 101-103.
- Hartnell A, Robinson DS, Kay AB and Wardlaw AJ. 1993. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology*, 80: 281-286.
- Hashimoto T, Akiyama K, Kawaguchi H, Maeda Y, Taniguchi M, Kobayashi N and Mori A. 2004. Correlation of Allergen-Induced IL-5 and IL-13 Production by Peripheral Blood T Cells of Asthma Patients. *Int Arch Allergy Immunol*, 134: 7-11.
- Hebestreit H, Yousefi S, Balatti I, Weber M, Cramer R, Simon D, Hartung K, Schapowal A, Blaser K and Simon HU. 1996. Expression and function of the Fas receptor on human blood and tissue eosinophils. *Eur J Immunol*, 26: 1775-1780.
- Hellman C, Hallden G, Hylander B and Lundahl J. 2003. Regulation of the interleukin-5 receptor alpha-subunit on peripheral blood eosinophils from healthy subjects. *Clin Exp Immunol*, 131: 75-81.
- Hellmrich B and Gross WL. 2004. Recent progress in the pharmacotherapy of Churg-Strauss syndrome. *Exp Opin Pharmacol*, 5: 25-35.
- Hemler ME, Jacobson JG, Brenner MB, Mann D and Strominger JL. 1985. VLA-1: a T cell surface antigen which defines a novel late stage of human T cell activation. *Eur J Immunol*, 15: 502-508.
- Hendry J. 2003. Lung abnormalities resolved faster among patients with SARS treated with interferon alfacon-1 and corticosteroids. *J Am Med Ass*, 290: 3222-3228.
- Hirata N, Kohrogi H, Iwagoe H, Goto E, Hamamoto J, Fujii K, Yamaguchi T, Kawano O and Ando M. 1998. Allergen exposure induces the expression of endothelial adhesion molecules in passively sensitized human bronchus: time course and the role of cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 18: 12-20.

- Hodge S, Hodge G, Flower R and Han P. 1999. Methyl-prednisolone up-regulates monocyte interleukin-10 production in stimulated whole blood. *Scand J Immunol*, 49: 548-53.
- Honoré I, Nunes H, Groussard O, Kambouchner M, Chambellan A, Aubier M, Valeyre D and Crestani B. 2003. Acute respiratory failure after Interferon- γ therapy of end-stage pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 167: 953-957.
- Hoontrakoon R, Chu HW, Gardai SJ, Wenzel SE, McDonald P, Fadok VA, Henson PM and Bratton DL. 2002. Interleukin-15 inhibits spontaneous apoptosis in human eosinophils via autocrine production of granulocyte macrophage-colony stimulating factor and nuclear factor- κ B activation. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 26: 404-412.
- Horie S, Okubo Y, Hossain M, Sato E, Nomura H, Koyama S, Suzuki J, Isobe M and Sekiguchi M. 1997. Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. *Int Med*, 36: 179-185.
- Ishizuka T, Morita K, Hisada T, Ishizuka T, Ando S, Adachi M, Dobashi K and Mori M. 1996. The direct effect of interferon-gamma on human eosinophilic leukemia cell lines: the induction of interleukin-5 mRNA and the presence of an interferon-gamma receptor. *Inflammation*, 20: 151-163.
- Janeway CA und Travers P. 1995. *Immunologie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
- Jeffrey PK, Godfrey RW and Adelroth GE. 1992. Effects of treatment on airway inflammation and thickening of basement membrane reticularcollagen in asthma: a quantitative light and electron microscopic study. *Am Rev Respir Dis*, 145: 890-899.
- Jenkins HA, Reubin C, Szeffler SJ, Covar R, Gelfand EW and Spahn JD. 2003. A comparison of the clinical characteristics of children and adults with severe asthma. *Chest*, 124: 1318-1324.
- Joos L, Carlen Brutschke IEA, Laule-Kilian K, Crawen M, Tamm M and Brutschke MH. 2004. Systemic Th1- and Th2-gene signals in atopy and asthma. *Swiss Med Wkly*, 134: 159-164.
- Kanazawa H, Mamoto T, Hirata K and Yoshikawa J. 2003. Interferon therapy induces the improvement of lung function by inhaled corticosteroid therapy in asthmatic patient with chronic hepatitis C virus infection. *Chest*, 123: 600-603.
- Katoh S, Taniguchi H, Matsubara Y, Matsumoto N, Fukushima K, Kadota J, Matsukura S and Kohno S. 1999. Overexpression of CD44 on alveolar eosinophils with high concentration of soluble CD44 in bronchoalveolar lavage fluid in patients with eosinophilic pneumonia. *Allergy*, 54: 1286-1292.
- Kay AB, Phipps S and Robinson DS. 2004. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma. *Trends Immunol*, 25: 477-482.
- Keatings VM, Collins PD, Scott DM and Barnes PJ. 1996. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 153: 530-534.

- Kincade PW, Zheng Z, Katoh S and Hanson L. 1997. The importance of cellular environment to function of the CD44 matrix receptor. *Curr Opin Cell Biol*, 9: 635-642.
- Kips JC, Tournoy KG and Pauwels RA. 2001: New anti-asthma therapies: suppression of the effect of interleukin (IL)-4 and IL-5. *Eur Respir J*, 17: 499-506.
- Kips JC, O'Connor BJ, Langley SJ, Woodcock A, Kerstjens HA, Postma DS, Danzig M, Cuss F and Pauwels RA. 2003. Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study. *Am J Respir Crit Care Med*, 167: 1655-1659.
- Kramer P. 1996. Apoptose im Immunsystem: Mord oder Selbstmord. *Pharmazie in unserer Zeit*, 25: 306-310.
- Kraus MR und Wilms K. 2000. Interferon- α Wirkung, Indikationen, Therapieüberwachung und Nebenwirkungen. *Der Internist*, 41:1399-1406.
- Kroegel C. 1998. Asthma bronchiale Pathogenetische Grundlagen, Diagnostik, Therapie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Kroegel C. 2001. Asthmatherapie Leitfaden einer pathogenetisch begründeten Therapie. Steinen: ZETT-Verlag.
- Kroegel C. 2002. Asthma bronchiale Pathogenetische Grundlagen, Diagnostik, Therapie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Kroegel C, Virchow JC and Walker C. 1993. T-lymphocyte activation in bronchial asthma. *N Engl J Med*, 328: 1639-1640.
- Kroegel C, Jaeger L and Walker C. 1997. Is there a place for intrinsic asthma as a distinct immunopathological entity? *Eur Respir J*, 10: 513-515.
- Kroegel C, Foerster M, Workalemahu G und Mock B. 2001. Die asthmatische Entzündung. *Z Ärztl Fortbild Qualitätssich*, 95: 677-683.
- Kroegel C, Liu MC, Hubbard WC, Lichtenstein LM and Bochner BS. 1994. Blood and bronchoalveolar eosinophils in allergic subject after segmental antigen challenge: surface phenotype, density heterogeneity, and protanoid production. *J Allergy Clin Immunol*, 93: 725-734.
- Kroegel C, Virchow JC, Luttmann W, Walker C and Warner JA. 1994. Pulmonary immune cells in health and disease. The eosinophil leucocyte. Part I *Eur Respir J*, 7: 519-543.
- Kroegel C, Julius P, Matthys H, Virchow JC and Luttmann W. 1996. Endobronchial secretion of interleukin-13 following local allergen challenge in atopic asthma: relationship to interleukin-4 and eosinophil counts. *Eur Respir J*, 9: 899-904.
- Kroegel C, Kortsik C, Luttmann W, Matthys H, Werner P und Virchow JC. 1993. Pathomechanismen der asthmatischen Entzündungsreaktion. Entzündungszellen und Mediatoren. *Dtsch Ärztebl*, 90: 4-15.
- Kroegel C, Haefner D, Walker C, Luttmann W, Matthys H und Virchow JC. 1995. Immunpathogenese des allergischen Asthma bronchiale. *Dtsch med Wschr*, 120: 10-17.

- Kroegel C, Foerster M, Haefner D, Grahmann PR, Warner JA and Braun R. 2000. Putting priming into perspective-from cellular heterogeneity to cellular plasticity. *View point Immunol today*, 5: 218-222.
- Kroegel C, Mock B, Reißig A, Hengst U, Machnik A und Henzgen M. 2001. Therapie des Asthma bronchiale im Erwachsenenalter. *Z Ärztl Fortbild Qualitätssich*, 95: 677-683.
- Krug N, Veit J and Balke K. 2001. Cytokine profil of bronchoalveolar lavage-derived CD4⁺, CD8⁺, and $\gamma\delta$ T cells in people with asthma after segmental allergen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25: 125-131.
- Kumar M, Kong X, Behera AK, Hellermann GR, Lockey RF and Mohapatra SS. 2003. Chitosan IFN-gamma-pDNA nanoparticle (CIN) therapy for allergic asthma. *Genet Vaccines Ther*, 1: 3.
- Kuo ML, Huang JL, Yeh KW, Li PS and Hsieh KH. 2001. Evaluation of Th1/Th2 ratio and cytokine production profile during acute exacerbation and convalescence in asthmatic children. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 86: 272-276.
- Kuwano K, Bosken CH, Pare PD, Bai TR, Wiggs BR and Hogg JC. 1993. Small airway dimensions in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*, 148: 1220-1225.
- Lack G, Bradley KL, Hamelmann E, Renz H, Loader J, Leung DY, Larsen G and Gelfand EW. 1996. Nebulized IFN-gamma inhibits pulmonary allergic responses in mice. *J Immunol*, 157: 3216-3219.
- Lacy P, Mahmudi-Azer S, Bablitz B, Hagen SC, Velazquez JR, Paul Man SF and Moqbel R. 1999. Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon- γ in human eosinophils. *Blood*, 94: 23-32.
- Leckie MJ, Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ and Barnes PJ. 2000. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*, 356: 2144-2148.
- Leonard C, Tormey V, Burke C and Poulter LW. 1997. Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17: 368-375.
- Lopez JA, Newburger PE and Condino-Neto A. 2003. The effect of IFN- γ and TNF- α on the eosinophilic differentiation and NADPH oxidase activation of human HL-60 clone 15 cells. *J Interferon Cytokine Res*, 23: 737-744.
- Lopez Cabrera M, Santis AG, Fernandez Ruiz E et al. 1993. Molecular cloning, expression and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med*, 178: 537-547.
- Loutfy MR, Blatt LM, Siminovitch KA, Ward S, Wolff B, Lho H, Pha DH, Deif H, LaMere EA, Chang M, Kain KC, Farcas GA, Ferguson L, Latchford M, Levy G, Dennis JW, Lai EK and Fish EN. 2003. Interferon alfacon-1 plus corticosteroids in severe acute respiratory syndrome: a preliminary study. *JAMA*, 290: 3251-3253.
- Luepke N-P. 2002. *Moderne rationale Asthmatherapie*. Bremen, London, Boston: Uni-Med Verlag AG.

- Luttmann W, Knoechel B, Foerster M, Matthys H, Virchow JC and Kroegel C. 1996. Activation of human eosinophils by IL-13. *J Immunol*, 157: 1678-1683.
- Luttmann W, Opfer A, Dauer E, Foerster M, Matthys H, Eibel H, SchulzeOsthoff K, Kroegel C and Virchow JC. 1998. Differential regulation of CD95 (Fas/APO 1) expression in human blood eosinophils. *Eur J Immunol*, 28: 2057-2065.
- MacKenzie JR, Mattes J, Dent LA and Foster PS. 2001. Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4+ Th2 lymphocyte function. *J Immunol*, 167: 3146-3155.
- Magnan AO, Mely LG and Camilla CA. 2000. Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma. *Am J Resp Crit Care Med*, 161: 1790-1796.
- Masi AT, Hunder GG, Lie JT, Michael BA, Bloch DA, Arend WP, Calabrese LH, Edworthy SM, Fauci AS and Leavitt RY. 1990. The american college of rheumatology 1990 criteria for the classification of Churg-Strauss syndrome. *Arthritis Rheum*, 33: 1094-1100.
- Matsumoto K, Appiah-Pippim J, Schleimer RP, Bickel CA, Beck LA and Bochner BS. 1998. CD44 and CD69 Represent Different Types of Cell-surface Activation Markers for Human Eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 18: 860-866.
- Matsumoto K, Schleimer RP, Saito H, Iikura Y and Bochner BS. 1995. Induction of apoptosis in human eosinophils by anti-Fas antibody treatment in vitro. *Blood*, 86: 1437-1443.
- Matthys H. 1998. *Pneumologie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Meagher LC, Cousin JM, Seckl JR and Haslett C. 1996. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol*, 156: 4422-4428.
- Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G and Sallusto F. 2003. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat Immunol*, 4: 78-86.
- Mock B, Bartuschka B, Kroegel C und Wenz W. 1997. Behandlung eines steroidresistenten Churg Strauss Syndroms mit Interferon γ . *Atemw Lungenkrkh*, 23: 552-557.
- Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R and Moretta A. 2002. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol*, 32: 1205-1211.
- Mori A, Suko M, Nishizaki Y, Kaminuma O, Kobayashi S, Matsuzaki G, Yamamoto K, Ito K, Tsuruoka N and Okudaira H. 1995. IL-5 production by CD4+ T cells of asthmatic patients is suppressed by glucocorticoids and the immunosuppressants FK506 and cyclosporin A. *Int Immunol*, 7: 449-457.
- Mujataba MG, Villarete L and Johnson HM. 1999. IFN-tau inhibits IgE production in murine model of allergy and in an IgE-producing human myeloma cell line. *J Allergy Clin Immunol*, 104: 1037-1044.
- Murphy PT, Fennelly DF, Start M, O'Donnell JR. 1990. α interferon in a case of hypereosinophilic syndrome. *Br J Haematol*, 75: 619-620.
- Nagata S and Golstein P. 1995. The Fas death factor. *Science*, 267: 1449-1456.

- Nakao F, Ihara K, Kusuhaara K, Sasaki Y, Kinukawa N, Takabayashi A, Nishima S and Hara T. 2001. Association of IFN-gamma and IFN regulatory factor 1 polymorphisms with childhood atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 107: 499-504.
- Nishikawa K, Mori T, Ako H, Hamada K, Saito S and Narita N. 1992. In vivo expression of CD69 on lung eosinophils in eosinophilic pneumonia: CD69 as a possible activation marker for eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 90: 169-74.
- Nolte D. 1995. *Asthma Das Krankheitsbild Der Asthmapatient Die Therapie*. München, Wien, Baltimore: Urban&Schwarzenberg.
- Nurse B, Haus M, Puterman AS, Weinberg EG and Potter PC. 1997. Reduced interferon-gamma but normal IL-4 and IL-5 release by peripheral blood mononuclear cells from Xhosa children with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 100: 662-8.
- Oehling AG, Akdis CA, Schapowal A, Blaser K, Schmitz M and Simon H-U. 1997. Suppression of the immune system by oral glucocorticoid therapy in bronchial asthma. *Allergy*, 52: 144-154.
- Oehling AG, Blaser K, Schmitz M und Simon H-U. 1995. Immunsuppressive Effekte durch systemische Steroidtherapie bei Asthma bronchiale und anderen chronisch-entzündlichen Lungenkrankheiten. *Atemw Lungenkrkh*, 6: 302-303.
- Peter RU, Gottlob P, Nadeshina N, Krahn G, Braun-Falco O and Plewig G. 1999. Interferon gamma in survivors of the Chernobyl power plant accident: new therapeutic option for radiation-induced fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 45: 147-152.
- Peters M. 1989. Mechanisms of action of interferons. *Sem Liv Dis*, 9: 235-239.
- Raub J, Spahn JD, Spurs W et al. 1995. Induction of altered glucocorticoid receptor binding affinity in peripheral blood mononuclear cells by IL-2 and IL-4 is dose dependent. *J Allergy Clin Immunol*, 95: 300A.
- Reißig A, Foerster M, Mock B, Schilder C und Kroegel C. 2003. Behandlung des Churg-Strauss-Syndrom mit Interferon- α . *Dtsch med Wschr*, 128: 1475-1478.
- Rhis S, Walker C, Virchow JC, Boer C, Kroegel C, Giri SN and Braun RK. 1996. Differential expression of $\alpha^E\beta_7$ integrins on bronchoalveolar lavage T lymphocyte subsets: regulation by $\alpha^4\beta_1$ -integrin crosslinking and TGF- β . *Am J Respir Cell Mol Biol*, 15: 600-610.
- Robinson DS, Ying S, Bentley AM, Meng Q, North J, Durham SR, Kay AB and Hamid Q. 1993. Relationships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airway methacholine responsiveness in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 92: 397-403.
- Roitt IM, Brostoff J und Male DK. 1991. *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Sano K, Yamauchi K, Hoshi H, Honma M, Tamura G and Shirato K. 1997. CD44 expression on blood eosinophils is a novel marker of bronchial asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 1: 67-71.

- Satoh Y, Kasama K, Kuwabara M, Yimin, Diao HY, Nakajima H, Kohanawa M and Minagawa T. 1999. Suppression of late asthmatic response by low-dose oral administration of interferon β in the guinea pig model of asthma. *J Interferon Cytokine Res*, 19: 887-894.
- Saunders MW, Wheatley AH, George SJ, Lai T and Birchall MA. 1999. Do corticosteroids induce apoptosis in nasal polyp inflammatory cells? In vivo and in vitro studies. *Laryngoscope*, 109: 785-790.
- Schandene L, Del Prete GF, Cogan E, Stordeur P, Crusiaux A, Kennes B, Romagnani S and Goldman M. 1996. Recombinant interferon α selectively inhibits the production of interleukin 5 by human CD4⁺-T-cells. *J Clin Invest*, 97: 309-15.
- Schmitz M, Seelbach H, Ehmann R and Simon H-U. 2001. Clinical response to Interferon- α in steroid-resistant bronchial asthma. *Allergy*, 68: 99-100.
- Schumann C. 2003. Expansion von $\alpha^E\beta_7^+CD4^+$ -T-Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavage als Marker für pulmonale Fibrosen [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Schwinghackl A, Duszyk M, Brown N and Moqbel R. 1999. Human eosinophils release matrix metalloproteinase-9 on stimulation with TNF- α . *J Allergy Clin Immunol*, 104: 983-989.
- Seder RA and Paul WE. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺-T cells. *Annu Rev Immunol*, 12: 635-673.
- Seelbach H, Ehmann R, Simon H-U und Schmitz M. am 2.12.1999 in Bochum. Interferon- α beim steroidresistenten Asthma bronchiale und Churg-Strauss-Syndrom. Anlässlich der 35. Tagung der Gesellschaft für Lungen- und Atemwegsforschung e.V. in der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie.
- Seelbach H, Ehmann R, Simon H-U und Schmitz M. 2000. Interferon- α beim steroidresistenten Asthma bronchiale und Churg-Strauss-Syndrom. *Atemw Lungenkrkh*, 26: 354-355.
- Selroos O, Pietinalho A, Lofroos AB and Riska H. 1995. Effect of early vs late intervention with inhaled corticosteroids in asthma. *Chest*, 108: 1228-1234.
- Sheikh H, Legg J, Lewis C, Peck D and Isacke C. 1998. Discrete domains within the hyaluronan receptor CD44 regulate membrane localization and cell migration. *Cell Adhes Commun*, 6: 149-156.
- Shi HZ, Xiao CQ, Zhong D, Qin SM, Liu Y, Liang GR, Xu H, Chen YQ, Long XM and Xie ZF. 1998. Effect of inhaled interleukin-5 on airway hyperreactivity and eosinophilia in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*, 157: 204-209.
- Shirai T, Suzuki K, Inui N et al. 2003. Th1/Th2 profile in peripheral blood in atopic cough and atopic asthma. *Clin Exp Allergy*, 33: 84-89.
- Simon H-U, Seelbach H, Ehmann R and Schmitz M. 2003. Clinical and immunological effects of low-dose IFN- α treatment in patients with corticosteroid-resistant asthma. *Allergy*, 58: 1250-1255.
- Simon L and Foster PS. 1999. Chemokine and cytokine cooperativity: eosinophil migration in the asthmatic response. *Immunology and Cell Biology*, 78: 415-422.

- Strieter RM, Starko KM, Enelow RI, Noth I and Valentine VG. 2004. Effects of Interferon-gamma 1b on Biomarker Expression in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Resp Crit Care Med*, 170: 133-140.
- Suda T, Takahashi T, Golstein P and Nagata S. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis family. *Cell*, 75: 1169-1178.
- Suzue K, Asai T, Takeuchi T and Koyasu S. 2003. In vivo role of IFN γ produced by antigen-presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. *Eur J Immunol*, 33: 2666-2675.
- Tatsis E, Schnabel A and Gross WL. 1998. Interferon-alpha Treatment of Four Patients with the Churg-Strauss-Syndrome. *An Int Med*, 129: 370-377.
- Tavernier J, Plaetinck G, Guisez Y et al. 1996. The role of interleukin-5 in the production and function of eosinophils. In: Whetton AD, Gordon J, (eds). *Cell biochemistry vol. 7. Hematopoietic cell Growth Factors and their Receptors*. New York: Plenum Press, 321-361.
- Tournoy KG, Kips JC and Pauwels RA. 2001. Is Th1 the solution for Th2 in asthma? *Clin Exp All* 2002, 31: 17-29.
- Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM and Krammer PH. 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, 245: 301-305.
- Turner H and Kinet JP. 1999. Signalling through the high-affinity IgE receptor FC ϵ RI. *Nature*, 402: 24-30.
- Uchio E, Ono SY and Ikezawa Z. 2000. Tear levels of interferon-gamma, interleukin (IL)-2, IL-4 and IL-5 in patients with vernal keratoconjunctivitis, atopic keratoconjunctivitis and allergic conjunctivitis. *Clin Exp All*, 30: 103-109.
- Umetsu DT and DeKryuff RH. 1999. Interleukin-10. The missing link in asthma regulation? *Am J Respir Cell Mol Biol*, 21: 562-563.
- Virchow JC, Walker C and Hafner D. 1995. T cells and cytokines in the bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 151: 960-968.
- Walker C, Bode E and Boer L. 1992. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activity and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Resp Dis*, 146: 109-115.
- Walsh GM, Sexton DW and Blaylock MG. 2003. Mechanisms of steroid action and resistance in inflammation. Corticosteroids, eosinophils and bronchial epithelial cells: new insights into the resolution of inflammation in asthma. *J Endocrinol*, 178: 37-43.
- Wang Q, Lin J and Sun H. 2000. The study of T helper cell subsets and relationship to relative cytokines and ventilatory function in asthmatic patients. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 23: 147-50.
- Weber F und Thimme R. 2003. Virale Anti-Interferon-Strategien: Mechanismen und Bedeutung für die Klinik. *Dtsch med Wschr*, 128: 323-325.

- Welte K, Ciobanu N, Moore MA, Gulati S, O'Reilly RJ and Mertelsmann R. 1984. Detective interleukin-2 production in patients after bone marrow transplantation and in vitro restoration of detective T lymphocyte proliferation by highly purified interleukin-2. *Blood*, 64: 380.
- Wiggs BR, Bosken C, Pare' PD, James A and Hogg JC. 1992. A model of airway narrowing in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*, 145: 1251-1258.
- Willer G und Menz G. 2003. Schwieriges Asthma – therapeutische Optionen und Grenzen anhand von Fallbeispielen [Vortrag]. In: 44. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Williams TJ. 2004. The eosinophil enigma. *J Clin Invest*, 113: 507-509.
- Wong CK, Ho CY and Ko FWS. 2001. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol*, 125: 177-183.
- Yamaguchi S, Kubo K, Fujimoto K, Honda T, Sekiguchi M and Sodeyama T. 1997. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid in patients with chronic hepatitis C before and after treatment with interferon alpha. *Thorax*, 52: 33-37.
- Yi-Qing C, Bjermer L, Fröjd Ö, Nettelbladt O, Karlsson-Parra A and Henriksson R. 1995. Effects of IL 2 treatment on different compartments of the irradiated rat lung analysed by bronchoalveolar lavage and lung tissue morphology. *Eur Respir J*, 8: 1872-1878.
- Yssel H, Lecart S and Pene J. 2001. Regulatory T cells and allergic asthma. *Microbes and Infection*, 3: 1-6.
- Zielinski RM and Lawrence WD. 1990. Interferon α for the hypereosinophilic syndrome. *Ann Intern Med*, 113: 716-718.
- Ziesche R und Block LH. 2002. Pneumologie: Zukunftsperspektiven. *Ärzte Woche*, 38: 165-169.
- Zhou CY, Crocker IC, Koenig G, Romero FA and Townley RG. 1997. Anti-Interleukin-4 inhibits immunoglobulin E production in a murine model of atopic asthma. *J Asthma*, 34: 5-201.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. C. Kroegel für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die umfassende und freundliche Betreuung bei der Anfertigung der vorliegenden Dissertation bedanken. Auch in schwierigen Phasen der Arbeit war er stets ein geduldiger Diskussionspartner, der mich durch konstruktive Hilfe bei der Suche nach Problemlösungen unterstützte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. M. Förster für seine engagierte und freundschaftliche Hilfe. Die intensiven wissenschaftlichen Diskussionen mit ihm und seine vielfältigen und kritischen Anregungen haben das Entstehen dieser Arbeit ganz wesentlich gefördert.

Den Mitarbeitern des Pneumologischen Forschungslabors der Klinik für Innere Medizin danke ich für die tatkräftige technische Unterstützung und Frau Y. Schlenker und Frau A. Hartmann für die Einführung in die Methodik der Immunzytologie.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich Schwester Christine aus der Pneumologischen Ambulanz aussprechen, ohne deren Hilfe die reibungslose Erfassung der Patientendaten nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn R. Nawrodt und Herrn T. Köttig für das kritische Durcharbeiten des Skriptes und für die Unterstützung bei der Gestaltung des Layouts.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Freund Steven und meinen Eltern für deren Unterstützung und Geduld.

Lebenslauf

Name: Bergmann
 Vorname: Nicole
 Geburtsdatum: 07.02.1979
 Geburtsort: Greiz
 Familienstand: ledig

Schulbildung:
 08/1985 – 06/1992 Realschule in Greiz
 08/1992 – 06/1997 Erstes Staatliches Gymnasium, Greiz
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Freiwilliges Soziales Jahr:
 10/1997 – 08/1998 Kreiskrankenhaus Greiz GmbH

Studium:
 09/1998 Immatrikulation an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Studiengang: Humanmedizin
 08/2000 Ärztliche Vorprüfung
 08/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 08/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 05/2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit:
 seit 06/2005 Assistenzärztin, Klinik für Augenheilkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Jena, den ____ . ____ . ____

Unterschrift des Verfassers

Publikationen

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen:

- Bergmann N, Foerster M, Reißig A, Mock B, Workalemahu G and Kroegel C. 2003. Immunomodulatory treatment of severe persistent asthma with interferon- α con-1 (IFN- α con-1). Effect on the clinical course of oral corticosteroid dose and eosinophil numbers. Eur Resp J, 22: 379.
- Kroegel C, Foerster M, Bergmann N, Mock B, Workalemahu G und Reißig A. 2003. Behandlung des schweren persistierenden Kortison-abhängigen und –resistenten Asthma bronchiale mit Interferon- α con-1 (IFN- α con-1). Erste Ergebnisse einer Fall-kontrollierten Studie. Med Klinik, 98: 148.
- Kroegel C, Bergmann N, Foerster M, Workalemahu G, Machnik A, Mock B and Reißig A. 2005. Interferon- α con-1 treatment of three patients with severe glucocorticoid-dependent asthma. Effect on disease control and systemic glucocorticoidsteroid dose. Respiration. In Druck.
- Bergmann N, Foerster M, Walther R, Reißig A, Kroegel C. 2006. Immunmodulatorische Therapie des schwer-persistierenden Kortikosteroidabhängigen Asthma bronchiale (Schweregrad IV) mit Interferon-alphacon-1 (IFN-alphacon-1). Ergebnisse einer Fall-kontrollierten Studie über 12 Monate. Poster 72. Kongress der deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 24.05.-29.05.2006

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Preise:

- Klinischer Förderpreis 2006 der deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e. V.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. C. Kroegel und Dr. rer. nat. M. Förster,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den ____ . ____ . _____

Unterschrift des Verfassers